

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Rôle de l'ancre glycosylphosphatidylinositol dans le trajet intracellulaire de l'hyaluronidase Hyal2

Van Moer, Kris

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

**Faculté des Sciences**

**ROLE DE L'ANCRE GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL DANS  
LE TRAJET INTRACELLULAIRE DE L'HYALURONIDASE HYAL2**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Kris VAN MOER

Juin 2002

# 1 Introduction

## 1.1 L'hyaluronan : brève introduction

Ce mémoire porte sur la localisation cellulaire d'une forme particulière d'hyaluronidase appelée Hyal2. Il existe plusieurs sortes d'enzymes qui dégradent l'hyaluronan, et leur localisation intra- ou extra-cellulaire est d'une grande importance. Or, les connaissances actuelles au sujet de la localisation et du fonctionnement d'Hyal2 restent disparates.

L'hyaluronan (**Fig. 1.1**) est un glycosaminoglycan linéaire, très simple, formé d'une répétition de milliers de disaccharides faits d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine, reliés en alternance par des liens  $\beta(1-3)$  et  $\beta(1-4)$ . Il est présent dans la majorité des tissus, généralement sous forme d'une chaîne de très haut PM<sup>1</sup> ( $> 10^6$  Daltons), mais parfois sous forme de fragments plus courts. La synthèse d'hyaluronan est indispensable au développement embryonnaire (Camenisch et al., 2000).

L'hyaluronan étonne par sa grande simplicité et par le nombre de fonctions biologiques qui lui sont attribuées, à la fois comme composé inerte des matrices extracellulaires et comme agent de prolifération et de migration cellulaire (Laurent, 1998 ; Lee & Spicer, 2000). Ce polysaccharide possède plusieurs types de récepteurs différents à la surface cellulaire, comme les molécules CD44, RHAMM ou LYVE-1. L'hyaluronan et certains de ses récepteurs sont même trouvés à l'intérieur des cellules, surtout durant les phases de division et de croissance (Evanko & Wight, 1999). Enfin, plusieurs propriétés de l'hyaluronan semblent dépendre de sa taille, ce qui donne une importance supplémentaire aux hyaluronidases, telles Hyal2, qui pourraient le découper en fragments plus petits.

## 1.2 Les hyaluronidases

### 1.2.1 Classification

L'activité hyaluronidasique fut identifiée pour la première fois en 1928 dans des extraits

---

<sup>1</sup> Une liste des abréviations est annexée.

testiculaires de mammifères (Duran-Reynals, 1928). Cet agent favorisait la diffusion des virus et toxines injectés par voie sous-cutanée ; il fut pour cette raison nommé “spreading factor”. Le terme “hyaluronidase” fut introduit par Karl Meyer en 1940 afin d’indiquer les enzymes qui dégradent l’hyaluronan (Meyer & Chaffee, 1940). A l’origine, Meyer classa les différents types d’hyaluronidases en trois groupes distincts, sur base de données biochimiques et de l’analyse des produits de la réaction (Meyer, 1971). Avec l’avancée des données génétiques, nous savons à présent que la classification de Meyer était remarquablement précise (Frost et al., 1996).

- Les hyaluronidases de mammifères (EC 3.2.1.35) sont toutes des endo-N-acétyl-hexosaminidases qui clivent les liaisons  $\beta(1-4)$ . Elles produisent surtout des tétrasaccharides et des hexasaccharides ; le travail de dégradation totale de l’hyaluronan est achevé par la  $\beta$ -glucuronidase et la N-acétylglucosaminidase, qui sont des enzymes lysosomales assez abondantes. Les hyaluronidases de mammifères dégradent aussi, dans une moindre mesure, les chondroïtine-sulfates et le dermatan-sulfate. Elles ont également une activité transglycosidasique, qui permet de créer des molécules hybrides entre, par exemple, des chaînes d’hyaluronan et de chondroïtine-sulfate. Les hyaluronidases présentes dans les venins d’hyménoptères appartiennent aussi à la même catégorie.
- Les hyaluronidases des glandes salivaires de sangsues, d’autres parasites ou de crustacés (EC 3.2.1.36) sont des endo- $\beta$ -glucuronidases. Ces enzymes coupent les liens  $\beta(1-3)$ , générant des tétrasaccharides et des hexasaccharides avec un acide glucuronique à l’extrémité non réduite.
- La troisième classe est celle des hyaluronidases bactériennes (EC 4.2.99.1), qui dégradent l’hyaluronan et certaines chondroïtine-sulfates. Ces enzymes agissent par un mécanisme différent : elles attaquent le lien  $\beta(1-4)$ , l’éliminent et produisent une désaturation du résidu glucuronique, créant une double liaison en C4–C5 (Li et al., 2000). On les appellent parfois “hyaluronate lyases” par opposition aux hydrolases des deux groupes précédents. Les lyases dépolymérisent complètement l’hyaluronan et constituent des éléments de virulence d’une grande importance, car elles exposent les tissus de l’hôte aux toxines bactériennes. Ainsi, le génome de *Clostridium perfringens* contient au moins 5 gènes d’hyaluronidases (Shimizu et al., 2002).

Le génome humain, quant à lui, contient six hyaluronidases paralogues possédant entre

elles 40 % d'identité (Csoka et al., 2001). Les gènes sont groupés en deux triplets liés étroitement sur les chromosomes 3p21.3 et 7q31.3. Cet arrangement pourrait résulter de diverses duplications géniques survenues avant l'émergence de mammifères modernes.

### 1.2.2 PH-20

La PH-20 ou hyaluronidase du spermatozoïde est la plus connue des hyaluronidases de mammifères (Austin, 1960 ; Lin et al., 1993). Elle facilite la pénétration du cumulus oophorus ainsi que l'attachement du spermatozoïde à la zona pellucida. La PH-20 est liée par une ancre GPI à la surface externe de la tête du spermatozoïde, de même qu'à la surface interne de la membrane acrosomiale. La chaîne polypeptidique de la PH-20 crée plusieurs ponts disulfures et présence 5 à 6 N-glycosylations. L'activité hyaluronidasique de la PH-20 se manifeste essentiellement à pH neutre, bien qu'il apparaisse une activité à pH acide après la réaction acrosomiale. On pense que cette réaction s'accompagne d'une déglycosylation partielle de la PH-20 et/ou d'un clivage endoprotéolytique dans la région C-terminale, révélant l'activité enzymatique à pH acide (Cherr et al., 2001).

De plus, il a été montré récemment que l'hyaluronan peut se lier à la PH-20 par l'intermédiaire d'un site distinct du site catalytique. Cette réaction entraîne une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, facilitant l'attachement du spermatozoïde à la zona pellucida (Cherr et al., 2001). La PH-20, hyaluronidase à ancrage GPI, peut donc aussi être considérée comme un récepteur à l'hyaluronan. Il est intéressant de constater que le domaine supposé lier l'hyaluronan (AA 205 à 235 de la PH-20) présente 60 % d'identité avec la région correspondante d'Hyal2, une hyaluronidase qui possède probablement aussi une ancre GPI.

### 1.2.3 Hyal1

Cette hyaluronidase active à pH acide est connue depuis des décennies mais n'a été isolée que récemment. Ce fut la première hyaluronidase à être purifiée à partir de tissus somatiques de mammifères, en l'occurrence du plasma (Afify et al., 1993), pour être ensuite clonée, séquencée et exprimée (Frost et al., 1997). Hyal1 possède environ 40 % d'identité en AA avec la PH-20. Les plus importantes quantités d'ARNm d'Hyal1 sont localisées dans les

organes parenchymateux tels que le foie, les reins, la rate et le coeur. L'urine, connue depuis longtemps pour son activité hyaluronidasique considérable, contient Hyal1 à une concentration 100 fois supérieure à celle trouvée dans le plasma.

Une deuxième forme d'Hyal1 a été découverte dans l'urine, délétée d'environ 100 acides aminés dans la région carboxy-terminale, résultant en deux chaînes peptidiques liées par un pont disulfure (Stern & Csoka, 2000). Les deux isoformes d'Hyal1 possèdent des activités spécifiques similaires.

Le rôle d'Hyal1 semble être de contrôler les taux d'hyaluronan plasmatiques, et probablement tissulaires. Une déficience congénitale en Hyal1 a été décrite chez l'homme (Triggs-Raine et al., 1999) ; elle donne un phénotype discret : accumulation d'hyaluronan dans les tissus mous et dans la peau.

#### **1.2.4 Autres hyaluronidases de mammifères**

Fin des années 1990, plusieurs séquences d'ADNc codant pour des polypeptides proches de la PH-20 ont été déposées dans les banques de données. Trois de ces gènes sont localisés dans la région chromosomique 3p21.3. Comme ces trois gènes sont fréquemment délétés dans des lignées cellulaires de cancer du poumon, ils furent à l'origine nommés LuCa-1, -2, et -3 (pour Lung Cancer). Il fut démontré plus tard que ces trois gènes codaient respectivement pour les hyaluronidases Hyal1, décrite ci-dessus, ainsi qu'Hyal2 et Hyal3, dont les gènes sont donc rassemblés sur un même chromosome. Il est possible que l'une ou l'autre de ces hyaluronidases soit un suppresseur tumoral. D'autres séquences de protéines homologues aux hyaluronidases ont été découvertes (Stern & Csoka, 2000 ; Comtesse et al., 2001).

#### **1.2.5 Hyal2**

##### **1.2.5.1 *Le gène et la structure de la protéine***

En 1997, le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie a cloné une forme d'Hyal2, en criblant une banque d'ADNc de rein de rat au moyen d'une sonde générée sur base d'homologie de séquence avec les hyaluronidases connues à ce moment (Flamion et al., 1998). La séquence d'ADNc a été déposée dans GenBank en 1997. L'année suivante, un groupe

autrichien a publié les résultats d'une étude préliminaire de formes recombinantes d'Hyal2 humaine et murine (Lepperdinger et al., 1998).

Le gène *Hyal2* comprend environ 3.6 kb d'ADN génomique (Strobl et al., 1998). Sa séquence codante s'étend sur 4 exons interrompus par 3 introns. L'analyse des 473 AA de la protéine Hyal2 indique la présence d'une séquence signal d'environ 20 AA en position N-terminale et d'une extrémité C-terminale très hydrophobe, suggérant qu'Hyal2 est ancrée en membrane par une ancre GPI (Gillot, 1998). Ces éléments seront discutés avec plus de détails dans la partie RESULTATS.

### **1.2.5.2      *Distribution tissulaire et localisation cellulaire***

Des Northern blots de tissus humains et des Western blots de tissus murins ont révélé la présence de l'ARNm d'*Hyal2* et de sa protéine dans de nombreux tissus : coeur, placenta, poumon, foie, muscles squelettiques, rein, pancréas. Seul le cerveau adulte est pauvre en Hyal2. En revanche, le gène *Hyal2* est fortement exprimé dans le cerveau des embryons de souris, mais il s'éteint 1 à 2 semaines après la naissance (Lepperdinger et al., 2001). Cette diminution de la transcription est attribuée à une méthylation d'îlots CpG dans le promoteur et la région 5' non traduite. Ces données suggèrent qu'Hyal2 participe au développement du cerveau.

Les résultats publiés par Lepperdinger et al. (1998) après expression d'Hyal2 en cellules de gliome ont montré un pH optimal d'activité de 3.8 et une colocalisation subcellulaire avec le LysoTracker Red, un fluorophore qui s'accumule dans des vésicules acides, y compris les lysosomes. Ces éléments ont paru suffisamment convaincants pour énoncer explicitement une localisation lysosomale d'Hyal2 (Lepperdinger et al., 1998). Il semble en réalité que la distribution cellulaire d'Hyal2 soit plus complexe, comme l'admettent maintenant les mêmes auteurs (Lepperdinger et al., 2001). En effet, après expression d'Hyal2 dans différentes cellules, aucune colocalisation n'a été observée avec la cathepsine C lysosomale (Gillot, 1998). Par contre, une partie des molécules d'Hyal2 est toujours retrouvée dans la fraction membranaire. Plusieurs études indiquent que la majorité des protéines Hyal2 sont liées à la membrane plasmique via une ancre GPI (Mertens-Strijthagen et al., 2002), comme montré plus tôt pour l'hyaluronidase PH-20. De plus, lorsqu'on exprime Hyal2 dans des cellules dépourvues de récepteurs au mannose-6 phosphate (M6PR), la distribution de l'enzyme dans le lysat cellulaire ou dans la fraction membranaire reste inchangée. Ceci indique, soit que l'enzyme est transportée vers les lysosomes indépendamment du M6PR, soit qu'elle n'est pas

lysosomale. Enfin, la situation *in vivo* de la protéine endogène dans différents types cellulaires doit encore être étudiée. Les anticorps disponibles jusqu'à présent n'ont pas encore permis ce travail d'immunodétection, et d'autres approches sont donc requises.

#### **1.2.5.3 Fonctions**

La ou les fonctions d'Hyal2 n'ont pas encore été explorées en détail. Il apparaît déjà, cependant, que son activité enzymatique est tout à fait originale, puisqu'Hyal2 ne serait capable de cliver la chaîne d'hyaluronan que partiellement, en laissant des fragments résiduels d'environ 20 kDa (Lepperdinger et al., 1998 ; Flamion et al., 1998). Autrement dit, lorsqu'Hyal2 rencontre son substrat de haut PM, l'enzyme s'attaque à une série de liaisons saccharidiques pour autant que celles-ci soient contenues dans une chaîne suffisamment longue. Lorsque la taille des molécules résiduelles d'hyaluronan atteint ~20 kDa, l'action enzymatique d'Hyal2 s'éteint, alors que celle d'Hyal1, par exemple, peut se poursuivre jusqu'à dégradation complète en tétra- ou hexasaccharides. Aucune explication plausible à ce phénomène n'est donnée jusqu'à présent, mais il faut savoir que les fragments d'hyaluronan ainsi générés ont une activité proinflammatoire (Mertens-Strijthagen et al., 2000).

#### **1.2.5.4 Hyal2, un récepteur à ancrage GPI ?**

Des résultats très originaux ont été obtenus récemment par Rai et al. (2001). Ces auteurs ont montré qu'Hyal2 est le récepteur qui médie l'entrée dans les cellules du rétrovirus de la maladie de Jaag chez le mouton (JSRV ou Jaagsiekte sheep retrovirus). Cet agent est responsable d'un cancer pulmonaire contagieux chez le mouton appelé carcinome pulmonaire ovin. Plusieurs types cellulaires de différentes espèces qui sont incapables d'être infectés par le JSRV y sont rendus complètement sensibles suite à une expression d'Hyal2. L'attache d'Hyal2 par une ancre GPI à la surface externe de la membrane plasmique a été prouvée dans ces expériences. Cette découverte surprenante, qui laisse penser qu'Hyal2 peut interagir par sa partie extracellulaire avec d'autres structures protéiques, a été confirmée cette année par deux autres études (Dirks et al., 2002 ; Alberti et al., 2002).

### **1.2.6 Rôles des hyaluronidases dans la dégradation de l'hyaluronan**



L'hyaluronan possède un taux de recyclage étonnamment rapide pour une molécule aussi volumineuse (Lee & Spicer, 2000). On estime qu'un tiers de tout l'hyaluronan du corps recycle quotidiennement. Les quantités d'hyaluronan circulant augmentent rapidement en réponse à un stress aigu tel qu'un choc, une septicémie, des brûlures étendues. Une telle augmentation pourrait être un mécanisme de survie. L'hyaluronan absorbe l'eau ; le volume du polymère peut alors être multiplié par 10 000. Ce polysaccharide pourrait donc augmenter le volume intravasculaire et empêcher ainsi les collapsus circulatoires, mais cette hypothèse reste non vérifiée.

De grandes quantités d'hyaluronan sont présentes normalement dans l'humeur vitrée de l'oeil, la gelée de Wharton du cordon ombilical, le fluide amniotique, les tissus foetaux et tous les tissus qui subissent une prolifération rapide. Or, la modulation des activités des hyaluronidases est probablement plus efficace que celle des synthases pour changer rapidement les quantités d'hyaluronan. De plus, les hyaluronan-synthases décrites jusqu'ici, même si elles diffèrent quelque peu dans leur fonction biosynthétique, ne semblent pas capables de produire des molécules d'hyaluronan avec des PM relativement faibles, c'est-à-dire avec une taille qui leur donne des propriétés de stimulation de la néoangiogenèse et de certains processus inflammatoires (Lee & Spicer, 2000). Dès lors, le rôle des hyaluronidases pourrait s'avérer essentiel dans ce domaine. Hyal1 et Hyal2 pourraient même agir de concert pour dégrader l'hyaluronan de haut PM, soit de façon complète, soit en fragments actifs à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule.

Sur base de ces éléments, on peut supposer qu'une attache membranaire d'Hyal2 par l'intermédiaire d'une ancre GPI lui conférerait des capacités particulières liées à sa localisation, soit en membrane plasmique, soit dans des vésicules intracellulaires appartenant par exemple aux " lipid rafts ". Ces radeaux lipidiques sont des domaines spécialisés des membranes dans lesquels se rassemblent de nombreuses protéines à attache GPI (Brown & London, 2000).

### ***1.3 Protéines à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI)***

De nombreuses protéines sont modifiées de manière covalente par ajout d'une ou plusieurs espèces lipidiques. En effet, on a estimé qu'entre 10 et 50 % de toutes les protéines comprises dans les cellules de mammifères peuvent être modifiées lipidiquement, soit par myristoylation, prénylation ou palmitoylation, soit par remplacement de l'extrémité

C-terminale au moyen d'une ancre GPI (Hooper & McIlhinney, 1999). Ces modifications influencent la structure de la protéine mais également son fonctionnement.

### 1.3.1 L'ancre GPI

Ce sont les études du trypanosome africain qui ont joué le rôle le plus important dans le développement des différents champs de recherche consacrés aux ancres GPI, à leur biosynthèse, à leur structure et à leur fonction (Ferguson, 1999). Le concept d'ancrage de protéines en membrane via un lien covalent au phosphatidylinositol a été développé fin des années 1970 (Ikezawa et al., 1976 ; Low & Finnean, 1977). Il a fallu attendre 1985 pour voir la recherche sur les ancres GPI s'intensifier ; depuis lors, plus de 200 protéines à ancre GPI ont été documentées. Il existe une maladie humaine peu fréquente mais grave, l'hémoglobinurie nocturne paroxystique, qui est due au développement d'un clone de cellules souches hématopoïétiques incapables de synthétiser les ancres GPI suite à une mutation somatique dans le gène de la phosphatidylinositol glycan classe A (Rosti, 2000). Cette maladie est caractérisée par des crises d'hémolyse et des thromboses.

### 1.3.2 Structure et biosynthèse des ancres GPI

Les ancres membranaires GPI sont présentes dans des organismes appartenant à la plupart des stades de l'évolution, depuis les protozoaires et les levures jusqu'aux vertébrés. Les eubactéries en semblent privées, comme l'indique l'analyse des génomes complets connus fin 1999 au moyen du programme de prédiction le plus performant (Eisenhaber et al., 2001). Le génome de *Saccharomyces cerevisiae* contiendrait 0.6 % de protéines à ancre GPI, et celui de *Caenorhabditis elegans*, 0.45 %.

Jusqu'à présent, toutes les protéines à ancre GPI ont été localisées soit dans le feuillet externe de la membrane plasmique, soit dans une membrane intracellulaire (lumière du RE ou vésicule de sécrétion). Ces protéines possèdent une séquence N-terminale hydrophobe qui dirige la protéine dans la lumière du RE rugueux où elle est clivée par la peptidase du signal, une protéine membranaire du RE. Le corps de l'ancre GPI, extrêmement conservé, est formé par l'addition séquentielle de sucres (3 mannoses et une glucosamine) et d'un éthanolamine

phosphate à une molécule de phosphatidylinositol (**Fig. 1.2**). Cette synthèse a lieu du côté cytoplasmique du RE rugueux. L'ancre connaît alors un renversement (flip-flop) à travers la membrane vers la lumière du réticulum. La liaison chimique de l'ancre GPI à l'acide aminé C-terminal de la chaîne polypeptidique (désigné site  $\omega$ ) se déroule lors d'une réaction de transamidation qui implique simultanément un clivage du propeptide C-terminal en aval du site  $\omega$ . Les mécanismes de base de la synthèse des ancras GPI et de leur attachement aux polypeptides naissants sont conservés chez tous les eucaryotes (Udenfriend & Kodukula, 1995).

Une analyse biostatistique récente s'est attachée à mieux définir les critères communs aux séquences d'AA C-terminales des protéines qui subissent un ancrage GPI (Eisenhaber et al., 1998). Il en ressort que les critères utilisés auparavant (Udenfriend & Kodukula, 1995), sur lesquels les analyses précédentes d'Hyal2 se sont basées (Gillot, 1998), semblent trop lâches. En réalité, la séquence signal qui indique une modification GPI de la préprotéine apparaît depuis l'AA situé en  $\omega-11$  jusqu'à l'extrémité C-terminale. Cette séquence signal contient 4 éléments essentiels :

1. une région de liaison non structurée d'environ 11 AA, depuis  $\omega-11$  jusqu'à  $\omega-1$  ;
2. une courte région de petits AA, de  $\omega-1$  jusqu'à  $\omega+2$ , qui inclut le site  $\omega$ , endroit de clivage du propeptide et d'attachement de l'ancre GPI ;
3. un intervalle d'AA modérément polaires, depuis  $\omega+3$  jusqu'à  $\omega+9$  ;
4. une queue hydrophobe.

Sur base de ces observations, un modèle de fonctionnement plus précis du remplacement de l'extrémité C-terminale par une ancre GPI dans le RE a été proposé (**Fig. 1.3**).

### 1.3.3 Outil de prédiction des ancras GPI

A la suite des critères ainsi définis, un programme internet “ Big-II predictor ” a été instauré sur le site : <http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/>. Cet algorithme très fiable permet d'évaluer, dans une séquence donnée, la probabilité de la présence d'une modification GPI et de prédire le meilleur site  $\omega$  potentiel. Cet outil sera utilisé pour l'analyse d'Hyal2 (cf.

RESULTATS).

### 1.3.4 Devenir des protéines à ancre GPI

#### 1.3.4.1 Généralités

Les protéines à ancre GPI nouvellement synthétisées quittent le RE dans des vésicules tapissées de la protéine cargo COP II et se déplacent via le Golgi vers la membrane plasmique (Muniz & Riezman, 2000). Puisque les protéines à ancre GPI se situent dans la lumière du RE, elles sont incapables d'interagir directement avec le manteau de COP II. Ceci implique l'existence d'adaptateurs transmembranaires pour joindre les protéines GPI et les composants cytosoliques du manteau.

Le transport des protéines à ancre GPI du RE vers le Golgi semble se faire par des vésicules spécialisées dont la constitution repose sur la présence de domaines lipidiques particuliers dans le RE lui-même (Muniz et al., 2001). Dans les cellules de mammifères, ces vésicules de transport des protéines à ancre GPI semblent exiger une synthèse de sphingolipides. Une déficience de la biosynthèse de l'ancre GPI ou du clivage du peptide précurseur de cette ancre entraîne une rétention de la protéine dans le RE (Doering & Schekman, 1996 ; Field et al., 1994). De même, chez *Trypanosoma brucei*, une protéine chimérique privée du peptide C-terminal précurseur de l'ancre GPI est retenue de façon spécifique dans le RE (McDowell et al., 1998). Cela suggère que l'ancre GPI elle-même agit dans le RE comme un signal de transport positif vers la voie de la sécrétion. Cependant, dans ce cas, les mécanismes de rétention des protéines déficientes dans le RE ne sont pas élucidés.

Le transport des protéines GPI du trans-Golgi vers la membrane plasmique, plus précisément la membrane apicale dans les cellules polarisées, dépend à la fois des radeaux lipidiques riches en sphingolipides et en cholestérol (Simons & Ikonen, 1997) et du degré de N-glycosylation de la protéine (Benting et al., 1999). Il a été démontré, dans le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie, qu'Hyal2 s'associe à des structures membranaires "résistantes aux détergents", qui sont l'équivalent biochimique de la notion de radeaux lipidiques (Mertens-Strijthagen et al., 2002). Malheureusement, à l'heure actuelle, ces radeaux lipidiques ne peuvent pas être visualisés directement dans les cellules (Jacobson & Dietrich, 1999). Les

techniques pour les démontrer restent indirectes.

Lorsqu'elles atteignent la surface cellulaire, les protéines à ancre GPI y restent logées pendant un certain temps. Elles peuvent ensuite être internalisées ou sécrétées dans l'espace extracellulaire. Certaines protéines GPI comme la phosphatase alcaline se retrouvent donc libres dans le milieu ectoplasmique, spécifiquement dans le sérum. D'une façon générale, le devenir des molécules à ancre GPI situées dans la membrane plasmique peut comprendre l'un ou l'autre des mécanismes suivants : endocytose, export sans clivage, sécrétion par hydrolyse ou protéolyse.

#### **1.3.4.2 Endocytose**

A l'exception de rares exemples (5'-nucléotidase, phosphatase alcaline), l'internalisation de protéines GPI semble se réaliser principalement dans des vésicules non tapissées de clathrine (Nosjean et al., 1997 ; Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001). En conséquence, cette internalisation doit être relativement lente, ce qui accroît le temps de vie en membrane des protéines GPI comparée à celle des protéines transmembranaires qui sont internalisées dans des vésicules tapissées de clathrine.

On peut penser qu'en raison de leur type d'attache membranaire, les protéines GPI diffusent au hasard à la surface membranaire ou se concentrent autour des cavéoles. Ainsi, la manière la plus probable d'internalisation serait via les cavéoles. Ce modèle n'est cependant pas prouvé. Dans le cas des récepteurs à ancre GPI, la liaison du ligand peut représenter une activation spécifique de l'endocytose. Ainsi, un modèle d'internalisation du folate a été proposé par Anderson (1993) : suite à la liaison du folate sur son récepteur à ancre GPI, la cavéole se ferme sans se détacher de la membrane. Le folate est alors transloqué dans le cytoplasme de la cellule via un transporteur membranaire. Dans de nombreux autres cas, l'endocytose des protéines GPI ne les conduit pas vers les lysosomes, mais plutôt dans des voies dépendant des radeaux lipidiques. Il existe en particulier un cycle bidirectionnel continu de protéines GPI entre la membrane plasmique et le Golgi, cycle qui repose sur des radeaux lipidiques (Nichols et al., 2001).

On peut dire que d'une façon générale, les facteurs impliqués dans l'internalisation des protéines GPI sont loin d'être élucidés.

### **1.3.4.3      *Export sans clivage***

La protéine GPI intacte avec son ancre peut également être exportée dans le milieu extracellulaire. Cela nécessite la formation de complexes protéo-lipidiques pour stabiliser la partie hydrophobe de l'ancre. Ces protéines GPI sont retrouvées dans le milieu sous forme de vésicules extracellulaires bien ordonnées ou de fragments de membrane rejetés après la mort cellulaire (Nosjean et al., 1997).

### **1.3.4.4      *Sécrétion par hydrolyse***

L'ancre GPI est un substrat potentiel pour l'hydrolyse enzymatique. Le clivage du phosphatidylinositol a été largement décrit. Les deux sites de clivage les plus fréquents se situent de part et d'autre du groupement phosphate qui lie l'inositol au glycérol. Le lien entre le phosphate et le glycérol est clivé par la phospholipase C phosphatidylinositol-dépendante (PI-PLC), alors que le lien entre l'inositol et le phosphate est coupé par la GPI-phospholipase D (GPI-PLD).

### **1.3.4.5      *Protéolyse***

Les protéines à ancre GPI sont avant tout des protéines et peuvent donc être dégradées par clivage protéolytique. Dans certains cas, cette dégradation, bien contrôlée, peut aboutir à la sécrétion de la protéine encore fonctionnelle.

## **1.3.5 Fonctions des protéines à ancre GPI**

Le GPI est une structure d'ancrage membranaire complexe, qui a été étonnamment bien conservée durant l'évolution. Cette conservation signe certainement des rôles importants, même si ceux-ci n'ont pas encore été délimités de façon systématique. En dehors du rôle de l'ancre GPI dans le trafic protéique vers la voie de la sécrétion (cf. ci-avant), plusieurs autres fonctions ont été suggérées. Elle sont résumées ci-dessous.

### **1.3.5.1      *Activation cellulaire***

Dans certains cas, des protéines à ancre GPI sont maintenues dans des vésicules submembranaires qui représentent un pool de molécules disponibles pour la membrane plasmique après activation de la cellule. Cette fonction n'est toutefois pas spécifique de l'ancre GPI.

Par ailleurs, en utilisant des anticorps contre certaines protéines GPI, on peut produire, par voie extracellulaire, un “crosslinking”, puis un rassemblement (“cluster”) à la surface membranaire de protéines GPI spécifiques. Cela aboutit bien souvent à l'activation cellulaire. Dans plusieurs cas, on a pu démontrer une coséquestration de protéines à ancre GPI et de tyrosine kinases non-récepteurs, ce qui pourrait expliquer la capacité des protéines GPI à transmettre des signaux à travers la membrane plasmique (Horejsi et al., 1999 ; cf. aussi la PH-20). Les réponses cellulaires comprennent entre autres une augmentation intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$ , une phosphorylation de tyrosine, une prolifération, une induction de cytokines et une génération de radicaux oxygénés. Puisque l'ancre GPI n'atteint pas le feuillet interne de la bicouche lipidique, certains composants intermédiaires doivent nécessairement transmettre l'information vers le cytoplasme. Une possibilité est l'interaction d'une protéine avec les chaînes acyl de l'ancre GPI au sein de la membrane, mais des interactions protéines-protéines, en “cis” de la membrane plasmique, sont plus probables. La protéine GPI pourrait y entrer en contact avec une protéine transmembranaire.

L'activation cellulaire par l'intermédiaire des protéines GPI peut aussi résulter de contacts intercellulaires. Il existe de nombreux exemples de la sorte dans les lymphocytes (Horejsi et al., 1999).

Dans certains cas, la liaison d'un activateur à son récepteur à ancre GPI active un agent protéolytique qui participe à la dégradation de la matrice extracellulaire. Ceci favorise la migration et l'invasion de la cellule.

### **1.3.5.2      *Activation enzymatique***

De nombreuses protéines à ancre GPI, y compris Hyal2, ont une activité enzymatique. Malheureusement, la littérature a rarement précisé l'implication de l'ancre GPI dans cette activité. C'est la localisation membranaire de la protéine, plutôt que la nature de son ancrage, qui semble être importante. Comme les protéines GPI évoluent dans un environnement lipidique particulier, il est raisonnable de penser que les lipides pourraient influencer les

propriétés des enzymes à ancrés GPI. Pour la plupart, ces éléments restent à étudier.

### **1.3.5.3      *Rôle de l'internalisation des protéines GPI***

Les facteurs qui influencent l'internalisation cellulaire ne sont pas identifiés, mais dans certains cas, la liaison d'un ligand peut déclencher l'internalisation. Celle-ci peut également être un moyen pour importer des nutriments dans la cellule, via un récepteur de surface comme celui du folate.

### **1.3.5.4      *Rôle de la libération de protéines GPI***

L'hydrolyse des ancrés GPI par une PI-PLC ou GPI-PLD mène à l'exposition d'inositol phosphoglycans (IPG) et à la libération respective dans la membrane de diacylglycérol ou d'acide phosphatidique (cf. Fig. 1.2). Ces deux métabolites sont des intermédiaires bien connus dans les voies de signalisation ; ils activent la cascade de messagers secondaires intracellulaires. Le diacylglycérol est impliqué dans l'activation de la protéine kinase C, et l'acide phosphatidique peut induire des effets de type facteurs de croissance, notamment l'activation de tyrosine kinase et la stimulation de la synthèse d'ADN. Les produits d'hydrolyse de l'ancre GPI, ainsi que les IPG peuvent participer à la signalisation cellulaire.

L'hydrolyse de l'ancre GPI par les phospholipases a également comme conséquence de libérer le corps peptidique. Les propriétés de la protéine peuvent être conservées ou non. Dans le premier cas, le changement de localisation peut-être une autre manière de réguler le rôle de la protéine qui d'un environnement en surface cellulaire, se retrouve dans les fluides extracellulaires circulants. Cela est bien démontré pour la PH-20 (cf. discussion au point 1.2.2). Une conséquence de la libération de protéines GPI dans le milieu est la possibilité d'atteindre d'autres surfaces cellulaires, spécialement lorsqu'elles sont sécrétées dans le plasma et qu'elles agissent en tant qu'hormones. La variation de contenu en cholestérol dans les membranes plasmiques pourrait réguler la libération de protéines GPI.

Au lieu de créer une fonctionnalité, le relargage de certaines protéines GPI de la surface cellulaire peut être une manière d'éliminer les molécules fonctionnelles de la membrane. Par exemple, l'élimination du "decay accelerating factor" (DAF) de la membrane plasmique rend la cellule sensible à la lyse par le complément (cf. hémoglobinurie nocturne paroxystique), et la perte d'épitopes antigéniques peut être impliquée dans la régulation d'interactions



intercellulaires. L'avantage d'une telle régulation est une réduction du temps de réaction en comparaison à la régulation transcription-traduction.

## **1.4 La “ Green Fluorescent protein ” (GFP).**

### **1.4.1 Introduction**

En biologie cellulaire, il est souhaitable de visualiser des événements cellulaires dans leur environnement naturel. Une technique particulièrement adaptée à ce but est l'utilisation de la “ green fluorescent protein ” (GFP), une protéine naturellement fluorescente extraite de la méduse *Aequorea victoria*. Le clonage du gène de la GFP (Prasher et al., 1992) a ouvert de nombreuses perspectives dans l'utilisation de cette protéine en biologie cellulaire et en génétique moléculaire. La GFP est aujourd'hui utilisée comme marqueur cellulaire pour identifier puis trier une population cellulaire transformée, comme gène rapporteur pour mesurer l'expression d'un gène dans des cellules vivantes, ou encore comme marqueur moléculaire pour visualiser, dans une cellule vivante, la dynamique d'une protéine couplée à la GFP (Tsien, 1998 ; Lippincott-Schwartz et al., 2001 ; Simpson et al., 2001).

### **1.4.2 Propriétés physico-chimiques**

La GFP est une protéine de 238 AA avec une masse moléculaire de 27 à 30 kDa en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE). Cette protéine reste remarquablement stable et résistante face à de nombreuses conditions physico-chimiques dénaturantes. Elle conserve sa fluorescence sur une large gamme de pH et de températures ainsi qu'en présence de bon nombre de protéases et de dénaturants.

Si la majeure partie de la protéine (AA 7 à 229) est nécessaire à l'acquisition de la fluorescence, son chromophore n'est constitué que de 3 AA en positions Ser65 – Tyr66 – Gly67. La structure cristalline révèle la constitution d'un tonnelet  $\beta$  enfermant une hélice  $\alpha$  (Ormö et al., 1996). Le chromophore est attaché à cette hélice et se situe parfaitement au centre du cylindre. Cette structure procure l'environnement adéquat au chromophore pour

émettre sa fluorescence en excluant les solvants et l'oxygène.

Chez *Aequorea victoria*, la fluorescence est engendrée par l'activation séquentielle de deux protéines : l'aequorine, une protéine dépendante du calcium, et la GFP. En présence d'oxygène, l'aequorine est couplée à la coelentérazine. La fixation de calcium provoque un changement conformationnel de l'aequorine qui induit une oxygénation de la coelentérazine. Cette réaction d'oxygénation s'accompagne d'une émission de lumière bleue. Dans la méduse, l'émission bleue de l'aequorine excite la GFP, ce qui conduit à l'émission d'une lumière verte. On parle de transfert d'énergie. Dans les systèmes hétérologues où l'aequorine est absente, la GFP peut être excitée directement par la lumière et ne nécessite pas de substrat exogène, de cofacteurs ni d'autres protéines. La GFP native possède deux pics d'excitation : un pic majeur à 395 nm et un autre de moindre intensité aux alentours de 477 nm. Le pic d'émission est à 509 nm.

### 1.4.3 L'EGFP (Enhanced GFP)

L'EGFP a subi une double substitution d'AA : la Phe64 et la Ser65 ont respectivement été remplacées par une leucine et une thréonine. Ces mutations procurent des propriétés nouvelles à l'EGFP. Pour la plupart des GFP, la formation optimale du fluorophore dépend du pH et de la température. Le signal fluorescent de la GFP native est nettement moins intense à 37°C qu'à 28°C. Cela provient d'une défaillance dans le repliement de la protéine : exprimées à 37°C, seules 25 % des molécules adoptent une conformation correcte, alors qu'à 28°C toutes l'obtiennent. L'EGFP, en revanche, peut acquérir la conformation adéquate à toute température physiologique, ce qui en fait une candidate idéale pour une étude en cellule vivante. De plus, après excitation à 488 nm, l'intensité de la fluorescence émise par l'EGFP est 35 fois supérieure à celle de la GFP native. Néanmoins, la fluorescence de l'EGFP diminue rapidement à des pH inférieurs à 7, contrairement à la GFP sauvage qui est résistante à une large gamme de pH.

### 1.4.4 L'EGFP en tant que marqueur moléculaire

Une des applications les plus réussies de la GFP fut certainement la fusion en phase entre le gène codant pour la GFP et celui d'une protéine d'intérêt. Le gène chimérique obtenu

---

est introduit dans l'organisme cible par expression stable ou transitoire. La localisation et/ou le trafic cellulaire de la protéine résultante peuvent alors être suivis dans la cellule vivante en microscopie fluorescente conventionnelle, sans nécessiter de fixation ni de perméabilisation cellulaire. La fusion idéale est celle qui préserve à la fois la fluorescence de la GFP et les ciblage et fonctions physiologiques de la protéine cible (Lippincott-Schwartz et al., 2001).

Aussi bien les extrémités amino- que carboxy-terminales de l'EGFP ont été fusionnées avec succès à une large gamme de protéines cytosoliques, membranaires, nucléaires, etc. La liaison entre la partie amino-terminale de la GFP et la partie carboxy-terminale de la protéine d'intérêt fonctionne généralement sans "linker", c'est-à-dire sans interposition d'une séquence d'AA supplémentaires. En revanche, la fusion d'une protéine à l'extrémité carboxy-terminale de la GFP peut être améliorée par l'ajout d'un peptide "spacer", prévu pour apporter une certaine flexibilité au sein de la molécule recombinante (Cubitt et al., 1995). Dans le cas des constructions utilisées dans ce travail, l'EGFP a été insérée dans la molécule d'Hyal2 sans "spacer".

## 2 Buts du travail

Hyal2 est une hyaluronidase de découverte récente qui dégrade l'hyaluronan de façon partielle. Cependant, sa localisation subcellulaire reste mal précisée. Certains éléments, notamment son pH d'activité acide, laissent penser que cette enzyme serait lysosomale, mais des résultats récents montrent plutôt une association à des membranes de type radeaux lipidiques ("lipid rafts"). Les résultats sont confortés par l'analyse de la séquence en AA qui suggèrent l'existence d'une extrémité C-terminale hydrophobe précurseur d'une ancre GPI. Le but de ce travail a été d'étudier la localisation subcellulaire d'Hyal2 selon qu'elle possède ou non cette extrémité C-terminale.

Pour ce faire, une étape préliminaire était de créer des chimères fluorescentes par fusion d'Hyal2 avec la protéine EGFP. Ces constructions ont été réalisées par les techniques de PCR et vérifiées par séquençage. Elles ont ensuite été transfectées dans les cellules COS-7. La suite du travail est constituée de 3 parties :

1. La première consiste en une analyse supplémentaire de la séquence d'Hyal2 à l'aide d'outils informatiques récents. Cette étude vise essentiellement à confirmer la présence d'une modification post-traductionnelle de type GPI et à caractériser la protéine.
2. Dans un second temps, des expériences de Western blots sur les homogénats des cellules exprimant les différentes chimères d'Hyal2 ont été effectuées. Ces Western blots ont pour objectif de vérifier le déroulement correct de l'expression intracellulaire des protéines couplées à l'EGFP, de déterminer s'il existe différentes formes de la protéine Hyal2 et de noter les dissemblances possibles entre Hyal2 délétée ou non de son extrémité C-terminale.
3. Finalement, une observation des constructions chimériques en microscopie, confocale ou non, est envisagée. Ce troisième volet comporte plusieurs parties :

- 
- La visualisation de l'EGFP couplée à Hyal2 : l'EGFP est utilisée dans ce cas comme rapporteur moléculaire.
  - Des marquages immunocytochimiques à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine elle-même ou à l'encontre d'organites cellulaires. L'excitation de l'Alexa 594 (fluorochrome fixé à l'anticorps secondaire utilisé) permet de procéder à certaines superpositions avec les images obtenues lors de l'excitation de l'EGFP.
  - Enfin, l'application de divers traitements cellulaires censés perturber la localisation cellulaire d'Hyal2.

## 3 Matériel et méthodes

### 3.1 Méthodes concernant l'ADN

#### 3.1.1 Culture de bactéries

##### 3.1.1.1 Milieu de culture

Milieu liquide : milieu LB (Luria-Bertani)

Composés pour 1 litre de milieu :

- Bacto-Tryptone 10 gr
- Extrait de levure 5 gr
- NaCl 10 gr

Porter à volume au moyen d'eau Milli-Q. Ajuster à pH 7.4 et autoclaver.

Milieu semi-solide sur boîte de Pétri (10 ml/boîte de Pétri de 57 cm<sup>2</sup>)

- Milieu LB
- Bacto-Agar 15 gr/ litre de LB

Autoclaver. Lorsque la température du milieu LB atteint environ 50°C, ajouter l'antibiotique sélectif. Couler les boîtes de Pétri.

##### 3.1.1.2 Antibiotiques

Ampicilline (Sigma) : solution préparée à 60 mg/ml dans de l'eau distillée puis stérilisée sur un filtre Millipore 0.22 µm. Stocker à -20°C. S'utilise à une dilution 1/1000.

### 3.1.2 Préparation d'ADN plasmidique

#### 3.1.2.1 *Protocole de la mini-préparation*

- Inoculer une colonie dans 5 ml de milieu LB contenant l'antibiotique sélectif.
- Laisser pousser la mini-culture pendant une nuit à 37°C sous agitation.
- Centrifuger 1 ml de suspension bactérienne pendant 5 minutes dans une centrifugeuse "microcentrifugeuse 4204 ALC" à 4°C et 13.000 rpm.
- Retirer le surnageant et ajouter 1 ml de culture sur le culot bactérien.
- Centrifuger 5 minutes dans les mêmes conditions.
- Retirer le surnageant.
- Suspendre le culot dans 300 µl de tampon : Tris-HCl 50 mM ; EDTA 10mM ; RNase A 100µg/ml ; pH 8.0.
- Ajouter 300 µl de solution NaOH 200 mM contenant 1% de SDS.
- Retourner l'éppendorf quelques fois et incubé 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de tampon acétate de potassium 3 M pH 5.2.
- Incuber 15 minutes à 4°C.
- Centrifuger à 13.000 rpm durant 15 minutes à 4°C.
- Récupérer le surnageant et y ajouter 0.7 volume d'isopropanol.
- Centrifuger à 13.000 rpm durant 15 minutes à 4°C.
- Décanté prudemment et ajouter 100 µl d'éthanol 70 %.
- Centrifuger 30 minutes à 4°C.
- Retirer le surnageant et laisser sécher le culot.
- Resuspendre le culot dans 20 µl d'H<sub>2</sub>O Milli-Q stérile.

### **3.1.2.2 Protocole de la maxi préparation**

L'extraction et la purification des plasmides contenus dans les bactéries furent réalisées au moyen du "Kit Qiagen-tip 500" de Qiagen. Le protocole d'emploi a été suivi sans modification. L'ADN purifié a été stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.1.3 Quantification de l'ADN au spectrophotomètre**

La densité optique (DO) de l'échantillon dont on veut connaître la concentration en ADN est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm. Tenant compte de la dilution préalable et sachant qu'une unité de DO correspond à 50  $\mu\text{g}$  d'ADN/ml, la concentration en ADN de l'échantillon peut être calculée.

Le spectrophotomètre peut également donner une indication sur la pureté de l'échantillon par calcul du rapport des DO à 260 nm et 280 nm (280 est la longueur d'onde d'absorption des protéines). Ce rapport se situe idéalement entre 1.6 et 2.0.

### **3.1.4 Electrophorèse en gel d'agarose**

#### **3.1.4.1 Principe**

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée afin de séparer des acides nucléiques qui diffèrent par leur poids moléculaire.

L'agarose est un polysaccharide extrait d'algues marines. Il est dissous dans un tampon chaud et versé dans une cuve, puis se gélifie lorsque la température diminue. Sous l'influence d'un champ électrique (environ 100 V), les fragments d'ADN déposés dans un puits à proximité de la cathode migrent à travers le gel vers l'anode à des vitesses qui dépendent de leur taille.

Afin de visualiser l'ADN, du bromure d'éthidium est ajouté au gel et au tampon d'électrophorèse. Cet agent s'intercale dans les doubles hélices et fluoresce lorsqu'il est soumis aux UV. Parallèlement aux échantillons, un marqueur de poids moléculaire est déposé dans un puits afin de donner une indication de la taille des fragments.



### 3.1.4.2 Solutions

Tampon de migration : TAE (1×). Composition :

- 40 mM Tris-HCl
- 20 mM CH<sub>3</sub>COONa
- 1 mM EDTA (pH 8.0)

Solution alourdissante (6×). Composition :

- bleu de bromophénol                      0.25%
- xylène cyanol FF                              0.25%
- ficoll (type 400)                              15%

La solution alourdissante a deux fonctions principales : faciliter la pénétration des fragments à travers le gel et permettre la visualisation de la migration grâce aux deux colorants bleus.

Gel d'agarose à 1%. Composition :

- 1 gr d'agarose
- 100 ml de tampon TAE
- 1µl de bromure d'Ethidium (10 mg / ml)

### 3.1.4.3 Protocole

- Peser l'agarose et ajouter le TAE.
- Peser l'ensemble.
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution de l'agarose (1 min 30 sec au four à micro-ondes à 650W).
- La différence de poids due à l'évaporation est compensée par un ajout d'eau Milli-Q.

- Ajouter 1 µl de bromure d’Ethidium (10 mg/ml ).
- Couler le gel dans le support adéquat et placer les peignes.
- Laisser polymériser.
- Déposer le gel dans la cuve (HORIZON 11-14 de Gibco BRL) contenant le tampon d’électrophorèse (800 ml de TAE et 8 µl de bromure d’Ethidium).
- Charger les puits avec les échantillons contenant la solution alourdissante (6×).
- Laisser migrer le temps voulu.

### 3.1.5 Restriction de l’ADN

Les enzymes de restriction sont produites par des bactéries pour lesquelles elles constituent un mécanisme de protection vis à vis des phages. Ces endonucléases clivent le double brin d’ADN au niveau de sites cibles spécifiques constituées de séquences palindromiques de 4 à 8 paires de bases. Deux types de coupures existent : la coupure nette à “bouts francs” ou la coupure décalée à “bouts collants”.

Deux enzymes de restriction (ROCHE) ont été utilisées dans le cadre de ce mémoire :

<u>Enzyme</u>	<u>Site de restriction</u>
<i>Bam</i> H I	5’-C   TTAAG-3’ 3’-GAATT   C-5’
<i>Xho</i> I	5’-C   TCGAG-3’ 3’-GAGCT   C-5’

Elles ont été utilisées avec le tampon H :

- 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 mM DTT, pH 7.5

Les composants de la réaction de restriction sont les suivants:

- le plasmide ou le fragment d'ADN à digérer
- le tampon d'incubation (10×)
- la ou les enzymes de restriction
- l'eau Milli-Q stérile pour porter à volume

Pour les enzymes choisies, la réaction de restriction se réalise dans un bain-marie de 37°C pendant une heure.

### 3.1.6 PCR

La PCR ou “polymerase chain reaction” est une méthode qui permet d'amplifier de manière exponentielle une séquence particulière d'ADN à partir d'un ADN cible (matrice). Une PCR se réalise généralement avec les composants suivants :

- l'ADN cible à amplifier ;
- deux oligonucléotides spécifiques de deux régions de cet ADN cible encadrant la séquence à amplifier ; ils sont appelés amorces ;
- une ADN polymérase thermorésistante ;
- les quatre bases nucléotidiques : dATP, dCTP, dGTP, dTTP ;
- et le tampon spécifique de la polymérase.

Le mélange subit un nombre variable de cycles (entre 25 et 40) composés de trois températures successives différentes :

- La température de dénaturation (94°C) permet la séparation des deux brins d'ADN de la matrice.
- La température d'hybridation, spécifique des amorces utilisées, permet leur association à la région correspondante de l'ADN cible, alors simple brin. Cette température se calcule en soustrayant 3 à 5°C de la température de fusion des amorces (température de fusion =  $2^{\circ}\text{C} \times [\text{nombre de AT}] + 4^{\circ}\text{C} \times [\text{nombre de GC}]$ ).
- La température d'élongation est la température optimale d'activité de la polymérase choisie.

Une longue étape de dénaturation (5 minutes) avant le début des cycles ainsi qu'une étape d'élongation finale (7 minutes) après les cycles sont ajoutées.

Dans ce travail, c'est la "Biotools DNA polymerase" qui a été utilisée, à une température d'élongation de 72°C, et dans le tampon suivant :

- 10 mM Tris-HCl pH8 ; 2 mM MgCl<sub>2</sub> ; 50 mM KCl ; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>.

Les amorces utilisées sont indiquées dans le **Tableau 3.1**.

**Tableau 3.1.** Liste des amorces utilisées pour la préparation des constructions. Les caractères gras indiquent les sites de restriction introduits.

Nom de l'amorce	Orientation	Séquence	Site introduit	Localisation
<b>s-BamHI</b>	sens	5'-AAG- <b>GAT-CCA</b> -GCA-TGC-GGG-CAG-GAC-TGG-3'	<i>Bam</i> HI	Hyal2 (111-130)
<b>as-stopXhoI</b>	anti-sens	5'-AA <b>C-TCG-AGT-TAA</b> -GCT-GCC-CGT-TTA-TGG-TTC-C-3'	<i>Xho</i> I / codon stop	Hyal2 (1432-1452)
<b>as-GPIAA</b>	anti-sens	5'-GGT-TCC-ACT-GCT-TGT-ACA-GCT-CGT-CCA-TGC-3'	-	Hyal2 (1439-1429)
<b>s-EGFPAA</b>	sens	5'-GCT-GTA-CAA-GCA-GTG-GAA-CCA-TAA-ACG-GGC-A-3'	-	EGFP (1395-1375)
<b>as-XhoIGPI</b>	anti-sens	5'- <b>CTC-GAG</b> -TTA-TAA-GGT-CCA-GGT-GAG-AGT-CA-3'	<i>Xho</i> I	EGFP (1385-1395)
<b>Hyal5SD</b>	sens	5'-ATC-ATC-ACA-CTG-GCC-CTA-GT-3'	-	Hyal2 (1428-1449)
				Hyal2 (1536-1513)
				Hyal2 (136-155)

### 3.1.7 Purification de l'ADN à partir d'un gel d'agarose

Les fragments d'ADN d'une longueur de 70 pb à 4 kb ont été séparés sur un gel d'agarose 1%. Ils ont ensuite été extraits et purifiés au moyen du kit "MinElute Gel extraction Kit" (Qiagen) selon les instructions du mode d'emploi.

### 3.1.8 Ligation

La réaction de ligation permet l'insertion d'un fragment d'ADN bordé de séquences de sites de restriction dans un plasmide linéarisé par les mêmes séquences. La ligation est réalisée par l'enzyme "T4 DNA ligase" qui forme une liaison phosphodiester entre l'extrémité 5'phosphate et l'extrémité 3' hydroxyle de chacun des doubles brins d'ADN à liguer.

La ligation se réalise dans un volume aussi faible que possible.

Composition du mélange :

- vecteur linéarisé par l'action de deux enzymes de restriction
- fragment d'ADN à insérer
- 1 µl de tampon de ligation (10×) = 500 mM Tris; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM DTT; 10 mM ATP; 250 µg/ml BSA pH 7.8
- 1 µl de T4 DNA ligase ( BioLabs) à 400 U/µl
- eau Milli-Q pour atteindre le volume final de 10 µl

La réaction de ligation se déroule pendant une nuit dans un bain-marie de 14°C.

### 3.1.9 Purification de l'ADN

#### 3.1.9.1 *Extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique*

Cette technique permet d'enlever les protéines présentes dans une solution d'ADN. Le phénol dénature et précipite les protéines, le chloroforme assure une bonne séparation entre les phases aqueuse et organique. L'alcool isoamylique (AIA) réduit la formation de bulles gazeuses durant l'extraction.

Protocole :

- Ajouter 1 volume de phénol/chloroforme/AIA (25:24:1 en volume) à la solution d'ADN à purifier, le tout à température ambiante.
- Vortexer 30 secondes à 1 minute.
- Centrifuger 3 minutes à température ambiante (13.000 rpm) dans la Biofuge.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN purifié (éviter l'interface où sont localisées les protéines).
- Précipiter à l'éthanol.

### **3.1.9.2      *Précipitation à l'éthanol***

La précipitation de l'ADN à l'éthanol a pour objectif d'éliminer les sels, de concentrer l'ADN et d'ôter toute trace de phénol.

Protocole :

- Ajouter 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 7.0 et 2.5 volumes d'éthanol 100% (froid à  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- Incuber 1 heure à  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifuger à 13.000 rpm pendant 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Décanter le surnageant et sécher le culot au Speed Vac pendant 10 minutes.
- Resuspendre le culot dans un volume adéquat d' $\text{H}_2\text{O}$  stérile.

## **3.1.10      Transformation des bactéries**

### **3.1.10.1      *Cellules électrocompétentes***

Le protocole s'effectue généralement avec les quantités suivantes :

- Ensemencer les bactéries dans 5 ml de LB.
- Mettre les bactéries à pousser pendant 7 heures à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation dans un Innova 4000 New Brunswick Scientific.
- Prélever 1 ml de la suspension bactérienne et ensemencer plusieurs récipients contenant 15 ml de LB.
- Mettre les bactéries à pousser la nuit à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation.
- Le lendemain ensemencer dans un erlenmeyer 250 ml de LB avec 2.5 ml de la suspension bactérienne saturée.
- Incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  en agitant à 200 rpm.
- Arrêter la croissance bactérienne en déposant l'erlenmeyer dans la glace lorsque la DO se situe entre 0.4 et 0.6.
- Transvaser la culture bactérienne dans 2 bouteilles Nalgène de 250 ml prérefroidies à  $4^{\circ}\text{C}$ .

- Centrifuger à  $2000 \times g$  pendant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  dans une centrifugeuse Beckman J-21B munie d'un rotor JA-14.
- Décanner le surnageant et resuspendre chaque culot bactérien dans 125 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ stérile froide.
- Centrifuger à  $2000 \times g$  pendant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Décanner et resuspendre chaque culot bactérien dans 60 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ stérile froide, regrouper le tout en une bouteille de 250 ml.
- Centrifuger à  $2000 \times g$  pendant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Décanner et resuspendre le culot dans 10 ml de glycérol 10 % ( $4^{\circ}\text{C}$ ).
- Transférer le contenu dans une bouteille Nalgène de 50 ml.
- Centrifuger à  $4000 \times g$  pendant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  dans la centrifugeuse Beckman J-21B munie d'un rotor JA-20.
- Resuspendre le culot dans 1.8 ml de glycérol 10% ( $4^{\circ}\text{C}$ ).
- Aliquoter par 100  $\mu\text{l}$  dans des cryotubes et conserver à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.1.10.2 Transformation par électroporation**

La technique de transformation par électroporation permet grâce à un choc électrique très court d'introduire de l'ADN exogène dans des microorganismes.

Protocole :

- Dégeler 100  $\mu\text{l}$  de bactéries électrocompétentes.
- Déposer 4  $\mu\text{l}$  du mélange de ligation au fond de la cuvette d'électroporation (Eurogentec) préalablement refroidie.
- Introduire les 100  $\mu\text{l}$  de bactéries électrocompétentes.
- Opérer le choc électrique à 2.300 V dans l'électroporateur "Gene Pulser" couplé au "Pulser Controller" de Bio-Rad.
- Ajouter 1 ml de LB et transvaser le tout dans un eppendorf de 1.5 ml.
- Incuber 1 heure dans un bain à  $37^{\circ}\text{C}$  en agitant de temps à autre.

- Etaler sur boîte de Pétri contenant un milieu sélectif (LB Bacto-Agar et ampicilline).
- Incuber la nuit à 37°C.

### 3.1.11 Séquençage automatique

Le séquençage automatique a été pratiqué sur un appareil ABI PRISM (Perkin Elmer). La réaction de séquençage est basée sur la méthode de terminaison de chaînes par incorporation de didésoxynucléotides. Chacun de ces 4 didésoxynucléotides est couplé à une molécule fluorescente différente. Il y a une réaction d'amplification linéaire du produit à partir d'une amorce spécifique par une ADN polymérase en présence de nucléotides. Cette amplification prend fin lorsque la polymérase incorpore un didésoxynucléotide.

#### 3.1.11.1 Réaction de séquençage

Réactifs :

- x µl ADN cible
- 1 µl d'une amorce sens ou anti-sens 10 µM (cf. **Tableau 3.2**)
- 6 µl du tampon Tris-HCl 2 M ; MgCl 5 mM ; pH 9
- de l'eau jusqu'à 12 µl
- puis est ajouté un mélange de didésoxynucléotides, de nucléotides et DNA polymérase

Cycle d'amplification :    96°C      96°C    50°C    60°C    4°C

Durée :      5 min    30 sec 15 sec 4 min over

pour 30 cycles

On procède ensuite à une purification par précipitation à l'éthanol.



**Tableau 3.2.** Liste des amorces utilisées en séquençage.

Nom de l'amorce	Orientation	Séquence	Localisation
<b>T7</b>	sens	5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GGA-3'	pcDNA I/Amp
<b>as-new-SP6</b>	anti-sens	5'-GCA-TTT-AGG-TAG-CAC-TAT-AG-3'	pcDNA I/Amp
<b>PB3</b>	sens	5'-TGC-ACA-CCT-GCC-CAT-GCT-G-3'	Hyal2 ( <b>434-453</b> )
<b>PB11</b>	sens	5'-GGC-CGC-TGT-CCT-GAC-GTG-G-3'	Hyal2 ( <b>786-805</b> )
<b>PB13</b>	sens	5'-ATG-GCC-ATG-GGC-GCT-GTG-3'	Hyal2 ( <b>1236-1253</b> )
<b>PB15</b>	sens	5'-CCA-TCG-GTG-AAA-GCG-CCG-3'	Hyal2 ( <b>1052-1069</b> )
<b>s-forward EGFP</b>	sens	5'-AAA-CGG-CCA-CAA-GTT-CAG-CG-3'	EGFP ( <b>746-766</b> )
<b>as-reverse EGFP</b>	anti-sens	5'-TCC-AGC-AGG-ACC-ATG-TGA-TC-3'	EGFP ( <b>1346-1326</b> )
<b>s2-EGFP</b>	sens	5'-ACA-CCC-TGG-TGA-ACC-GCA-T-3'	EGFP ( <b>1031-1049</b> )

## 3.2 Méthodes concernant les protéines

### 3.2.1 Préparation cellulaire

Toutes les transfections ont été réalisées dans la lignée cellulaire COS-7, obtenue à l'ATCC (American Type Culture Collection). Il s'agit d'une lignée de cellules fibroblastiques de rein de singe vert africain transformée par SV40. Les cellules COS-7 présentent de bonnes propriétés de transfection et d'expression de protéines exogènes. Elles ont été cultivées en milieu DMEM contenant 15 mM Hepes et 10 % de sérum bovin fœtal (FBS).

#### 3.2.1.1 Repiquage des cellules COS-7

- Aspirer le milieu de culture cellulaire.
- Rincer deux fois les cellules avec 10 ml de PBS.
- Détacher les cellules à l'aide de 6 ml de PBS-trypsine-EDTA.
- Incuber 15 minutes dans l'incubateur à 37°C.
- Neutraliser la trypsine par ajout de 45 ml de DMEM-Hepes 15 mM - FBS 10%.
- Prélever et transférer la suspension cellulaire dans un tube Falcon.
- Centrifuger pendant 10 minutes à 1200 rpm dans la centrifugeuse Jouan (CR312) à température ambiante.

- 
- Aspirer le surnageant.
  - Resuspendre le culot cellulaire dans 20 ml de DMEM-Hepes 15 mM-FBS 10%.
  - Compter les cellules à l'aide de la cellule de Bürker.
  - Repiquer 500.000 cellules par boîte de 80 cm<sup>2</sup>
  - Ajouter 25 ml de DMEM-Hepes 15 mM-FCS 10%.
  - Mettre les boîtes dans l'incubateur à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.1.2      *Récupération des extraits cellulaires et dosage des protéines***

- Ensemencer des puits de 9.6 cm<sup>2</sup> à 250.000 cellules.
- Prélever, 48 heures après la transfection, les milieux de culture cellulaire.
- Rincer le tapis cellulaire deux fois au PBS froid.
- Recouvrir à deux reprises les cellules de 0.5 ml de sucrose 0.25 M–tampon imidazole 3 mM–inhibiteurs de protéases (Complete de Roche), racler les cellules et récupérer la suspension.
- Avant le dosage des protéines, effectuer 10 passages successifs des extraits à travers une seringue munie d'une aiguille de 0.7 mm de diamètre.
- La concentration en protéines est mesurée de façon colorimétrique par le kit BioRad Protein Assay, selon les instructions fournies. La courbe standard est établie avec des concentrations croissantes de BSA.

### **3.2.1.3      *Concentration des milieux de culture cellulaire***

Les milieux cellulaires sont concentrés au moyen des “Ultrafree-4 Centrifugal filter Unit” de Millipore.

Protocole :

- Déposer 4 ml du milieu à concentrer dans “l’Ultrafree-4 centrifugal filter Unit”.
- Centrifuger à 2.500 rpm dans la centrifugeuse Jouan (CR312) à 4°C.
- Récupérer le milieu concentré.

Les sels et protéines de PM < 10 kDa traversent la membrane de cellulose ; seules les protéines de PM > 10 kDa sont retenues dans le milieu concentré.

### 3.2.2 Transfection cellulaire

Elle s'effectue au moyen de lipides cationiques Fugène-6 de Roche :

- Vingt-quatre heures avant la transfection, semer 50 000 cellules COS-7 dans chaque puits de 9.6 cm<sup>2</sup> (NUNC). Pour aboutir aux observations microscopiques, on dépose au préalable dans chaque puits, deux lamelles couvre-objet de 15 mm de diamètre stériles. Recouvrir le tout de 2 ml de DMEM-Hepes 15 mM-FBS 10%.
- Pour la transfection proprement dite, préparer par puits, dans deux eppendorfs stériles :
  - Solution A:       DMEM-Hepes 15 mM       100 µl  
                          Fugène-6 (Roche)       6 µl
  - Solution B:       DMEM-Hepes 15 mM       8 µl  
                          plasmide               0.7 µg
- Attendre 5 minutes avant de mélanger les deux solutions.
- Incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
- Ajouter 240 µl de DMEM-Hepes 15 mM-FBS 10% au mélange.
- Aspirer le milieu recouvrant les puits.
- Répartir 360 µl du mélange sur la ou les lamelles couvre-objet et laisser incuber 1 minute.
- Ajouter 1.200 µl de DMEM- Hepes 15mM- FBS 10%.
- Attendre quelques heures et ajouter 0.5 ml de DMEM-Hepes 15 mM-FBS 10%.

### 3.2.3 Western blot

#### 3.2.3.1 *Principe*

Après séparation des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS PAGE), une membrane PVDF (NEN) est mise en contact avec le gel et les bandes de protéines sont transférées sur la membrane par application d'un champ électrique. La membrane est alors incubée dans une solution contenant un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. La membrane subit ensuite une seconde incubation en présence d'un second anticorps couplé à la peroxidase. L'emplacement de la protéine peut ensuite être révélé par apport de  $H_2O_2$  et de luminol contenus dans le kit de chemiluminescence "ECL Plus" (NEN).

#### 3.2.3.2 *Réactifs*

Les quantités mentionnées permettent de couler deux gels de polyacrylamide d'une largeur de 10 cm et d'une hauteur de 8 cm.

*gel de séparation (12% en acrylamide) :*

- |                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| • Tris-HCl 1.5 M, pH8.8 ; SDS 0.4%    | 2.5 ml     |
| • Acrylamide 30% ; Bisacrylamide 0.8% | 4.0 ml     |
| • $H_2O$                              | 3.0 ml     |
| • TEMED                               | 10 $\mu$ l |
| • Persulfate d'ammonium 10%           | 0.5 ml     |

Pour certains gels le pourcentage d'acrylamide est de 8.5%. Les volumes sont ajustés en conséquence.

*gel d'empilement (3% en acrylamide) :*

- |                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| • Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 ; SDS 0.4%   | 1.25 ml  |
| • Acrylamide 30% ; Bisacrylamide 0.8% | 0.625 ml |
| • $H_2O$                              | 2.75 ml  |

- 
- |                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| • TEMED                     | 5 $\mu$ l |
| • Persulfate d'ammonium 10% | 0.375 ml  |

*bleu de chargement :*

- SDS 0.1%
- Bleu de bromophénol 0.06%
- Glycérol 14%
- Tris-HCl 300 mM, pH 6.8

*Tampon d'électrophorèse :*

- Tris-HCl 25 mM
- Glycine 192 mM
- SDS 0.1%, pH 8.6

*Tampon de transfert :*

- Tris-HCl 25 mM
- Glycine 192 mM
- Méthanol 20%

*Blotto 5% :*

- lait écrémé en poudre 5%
- PBS-Tween 0.1%

### **3.2.3.3 Electrophorèse en gel de polyacrylamide**

Un gel de polyacrylamide est réalisé par polymérisation d'acrylamide et de NN'-méthylènebisacrylamide. La réticulation du gel dépend directement du pourcentage d'acrylamide et de bisacrylamide utilisé et conditionne la mobilité électrophorétique des

protéines.

L'électrophorèse SDS-PAGE s'effectue en présence du détergent anionique, le dodécylsulfate de sodium dont les molécules se fixent par leur partie hydrophobe aux protéines. La répulsion électrostatique entre les molécules de SDS provoque le dépliement des protéines. Le nombre de molécules de SDS qui se lient à une protéine est approximativement proportionnel au PM de la protéine. La densité de charge étant équivalente quelle que soit la protéine, leur séparation repose donc sur une propriété unique : leur poids moléculaire.

Le  $\beta$ -mercaptoéthanol est un agent réducteur qui rompt les ponts disulfures intra- et intermoléculaires, libérant les chaînes polypeptidiques qui s'individualisent et se déplient.

L'addition du persulfate d'ammonium (initiateur de la réaction) et du TEMED (catalyseur de la réaction) déclenche la polymérisation du gel.

*Protocole :*

- Préparer le montage d'électrophorèse et tester son étanchéité.
- Couler le gel de séparation entre les deux plaques de verre jusqu'à 2 cm du bord supérieur.
- En surface du gel, déposer une couche d'isopropanol saturé en eau, pour tasser le gel et empêcher l'accès de l'oxygène qui inhibe la réaction de polymérisation.
- Laisser polymériser.
- Enlever l'isopropanol et rincer abondamment à l'eau puis éponger avec du papier absorbant.
- Couler le gel d'empilement jusqu'au bord supérieur de la petite plaquette de verre.
- Insérer le peigne et laisser polymériser.

### **3.2.3.4      *Traitement et dépôt des échantillons sur le gel***

- Diluer les extraits afin d'obtenir un volume identique pour chaque échantillon, en fonction de la quantité de protéines à déposer. Généralement, l'équivalent de 6 à 10  $\mu\text{g}$  de protéines d'un homogénat cellulaire sont déposés dans chaque puits.
- Ajouter un volume de solution alourdissante.

- Bouillir les échantillons 3 minutes au bain-marie.
- Centrifuger 1 minute à 13.000 rpm dans la centrifugeuse.
- Retirer le peigne du gel et sécher les puits à l'aide de papier absorbant.
- Déposer les échantillons dans les puits et charger en parallèle un puits à l'aide de 10  $\mu$ l d'étalon de PM.

### **3.2.3.5 Migration**

- Déposer le montage dans la cuve Mini-PROTEAN II (Biorad).
- Remplir les compartiments intérieur et extérieur de tampon d'électrophorèse.
- Régler la tension sur 80 V pendant 10 minutes pour faciliter la pénétration des échantillons dans le gel, puis élever à 100 V et laisser migrer pendant le temps désiré.

### **3.2.3.6 Transfert de protéines sur membrane en environnement semi-sec**

- Pendant la migration du gel :
  - Découper une membrane PVDF de 10  $\times$  6.5 cm par gel de polyacrylamide.
  - Découper 4 papiers Whatman 3MM de 10  $\times$  6.5 cm par membrane.
  - Incuber la membrane pendant 1 minute dans du méthanol 100% puis immerger au minimum 15 minutes dans du tampon de transfert.
  - Imbiber les papiers Whatman 3MM dans la solution de transfert.
- Arrêter la migration des protéines dans le gel de polyacrylamide.
- Détacher les deux plaques de verre l'une de l'autre.
- Couper et jeter le gel d'empilement.
- Réaliser le montage suivant horizontalement :
  - l'électrode positive
  - une éponge imbibée de solution de transfert
  - deux papiers Whatman 3MM

- la membrane PVDF
  - le gel de polyacrylamide
  - deux papiers Whatman 3MM
  - une éponge imbibée de solution de transfert
  - l'électrode négative
- Eviter la formation de bulles d'air entre les différentes couches.
  - Brancher les électrodes et programmer un courant de 8 V et de 250 mA maximum.
  - Laisser migrer 2 heures 30 minutes.

#### **3.2.3.7      *Traitement au rouge Ponceau***

Par intercalement réversible, le rouge Ponceau révèle l'ensemble des protéines présentes sur la membrane. Ceci permet de vérifier si la quantité de protéines déposée dans les différents puits est équivalente.

- Arrêter le transfert.
- Prélever la membrane et sécher à l'air ambiant.
- Déposer la membrane PVDF dans une boîte de Pétri et recouvrir de 20 ml de rouge Ponceau.
- Agiter pendant 15 minutes.
- Récupérer le rouge Ponceau.
- Rincer la membrane à l'eau Milli-Q jusqu'à obtention d'un signal satisfaisant.

#### **3.2.3.8      *Elimination des sites de liaison non spécifiques de la membrane***

Cette étape de préhybridation permet de saturer la membrane et ainsi empêcher une reconnaissance non spécifique des anticorps.



- Déposer la membrane dans une grande boîte de Pétri et recouvrir d'un volume suffisant de Blotto 5%.
- Agiter lentement toute la nuit à 4°C.

### **3.2.3.9      *Addition de l'anticorps primaire***

- Laver la membrane deux fois 5 minutes à température ambiante à l'aide de PBS-Tween 0.1%.
- Diluer l'anticorps primaire à la concentration désirée dans du PBS-Tween 0.1%-BSA 1%.
- Préparer 10 ml par membrane.
- Placer la membrane dans un sachet en plastique et verser la solution d'anticorps.
- Agiter lentement pendant 1 heure à température ambiante.

### **3.2.3.10      *Addition de l'anticorps secondaire***

- Retirer la membrane du sachet en plastique.
- Effectuer les lavages suivants sous forte agitation :
  - 1 × 15 minutes au PBS-Tween 0.1%
  - 3 × 5 minutes au PBS-Tween 0.1%
- Diluer l'anticorps secondaire dans du PBS-Tween 0.1%-BSA 1% pour obtenir une concentration de 1/2000. L'anticorps secondaire utilisé pour l'ensemble des Western blots dans le cadre de ce mémoire est un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (DAKO). Préparer 10 ml de solution d'anticorps par membrane.
- Placer la membrane dans un sachet en plastique et ajouter les 10 ml d'anticorps secondaire.
- Agiter lentement 45 minutes à température ambiante.

### **3.2.3.11      *Révélation des anticorps***

- Retirer la membrane du sachet en plastique.

- Effectuer les lavages suivants sous forte agitation:
  - 1 × 15 minutes au PBS-Tween 0.1%;
  - 3 × 5 minutes au PBS-Tween 0.1%.
- Révéler au moyen du kit de chemiluminescence ECL Plus de NEN. Les solutions de ce kit contiennent d'une part de l'eau oxygénée (le substrat de l'enzyme) et d'autre part du luminol. La peroxydase catalyse l'oxydation du luminol en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette réaction d'oxydation s'accompagne d'une libération de photons qui impressionnent le film de chemiluminescence.

*Protocole :*

- Mélanger des quantités équivalentes de chacune des deux solutions du kit.
- Verser dans un sachet contenant la membrane 0.125 µl du mélange par cm<sup>2</sup> de membrane.
- Laisser les membranes au contact de la solution pendant une minute.
- Déposer la membrane dans une cassette.
- Dans la chambre noire, recouvrir la membrane d'un film spécial pour chemiluminescence (Hyperfilm de Amersham).
- Développer le film.

### **3.3 Marquage immunocytochimique**

#### **3.3.1 Solutions utilisées lors des différents protocoles**

**•PBS**

- Dissoudre dans de l'eau MilliQ :
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                    1.54 mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                    27 mM
- NaCl                        1.54 mM
- Ajuster à pH 7.0-7.2

**•PBS-Ca 2 mM**

- Préparer une solution concentrée de  $\text{CaCl}_2$  dans de l'eau Milli-Q.
- Diluer cette solution dans du PBS pour atteindre la concentration en calcium de 2 mM.

**•PBS-BSA 2%**

- Dissoudre par agitation de la BSA dans une solution de PBS pour atteindre une concentration finale de 2% en poids de BSA.

**•PBS-Triton X100 0.5%**

- Déposer le flacon de Triton X100 dans un bain-marie de 37°C afin de liquéfier le détergent.
- Prélever le Triton X100 et mélanger au PBS pour atteindre une concentration de 0.5% en poids.
- Agiter et incubé dans le bain-marie jusqu'à dissolution complète.
- Conserver la solution à 4°C.

**•PBS-PAF 4%**

- Déposer du paraformaldéhyde (PAF) dans une solution de PBS pour atteindre une concentration de 4% en poids de PAF.
- Agiter et chauffer la solution à 60°C jusqu'à dissolution complète du PAF.
- Filtrer à travers un filtre Millex (Millipore) aux pores de 0.45  $\mu\text{m}$  de diamètre.

**•Mowiol**

- Placer 6 g de glycérol dans un Falcon conique de 50 ml.

- Ajouter 2.4 g de Mowiol et agiter très fort à l'aide d'un barreau aimanté.
- Ajouter 6 ml d'eau Milli-Q et agiter pendant 2 h à température ambiante.
- Ajouter 12 ml de Tris-HCl 0.2 mM à pH 8.5 et incuber à 53°C jusqu'à dissolution totale (agiter occasionnellement).
- Centrifuger à 5.000 rpm pendant 20 minutes dans la Jouan CR312.
- Aliquoter et congeler à -20°C.
- Après décongelation conserver à température ambiante.

### **3.3.2 Préparation des lamelles couvre-objet à observer sans fixation des cellules**

- Déposer 10 µl de milieu DMEM- 15 mM Hepes sur une lame porte-objet.
- Prélever une lamelle couvre-objet sur laquelle ont poussé les cellules et retourner la lamelle sur la goutte de milieu.
- Monter la lamelle et observer immédiatement au microscope inversé.

### **3.3.3 Marquage fluorescent des épitopes dans toute la cellule**

- Prélever les lamelles couvre-objet à la pince.
- Rincer 3 fois brièvement dans une solution de PBS-Ca 2 mM.
- Déposer la lamelle dans un puits de 9.6 cm<sup>2</sup> (boîte de 6 puits).
- Fixer les cellules 10 minutes dans 2 ml de PBS-PAF 4% à température ambiante.
- Rincer 1 fois brièvement au PBS.
- Perméabiliser les cellules dans 2 ml de PBS-Triton X100 0.5% pendant 30 minutes à température ambiante.
- Rincer 3 fois 5 minutes au PBS à température ambiante.
- Bloquer les sites de liaison non spécifiques par traitement de la lamelle 30 minutes dans 2 ml de PBS-BSA 2% à température ambiante.
- Rincer brièvement au PBS. Laisser ensuite un minimum de liquide.

- 
- Déposer 50 µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 2% sur la lamelle et recouvrir cette dernière d'un morceau de parafilm.
  - Laisser incuber l'anticorps pendant deux heures à température ambiante en "mini-chambre" humide (déposer du papier chiffon humidifié autour de la boîte et couvrir le tout de papier aluminium).
  - Drainer puis rincer 3 fois 5 minutes au PBS à température ambiante. Laisser un strict minimum de liquide.
  - Déposer 50 µl d'anticorps secondaire fluorescent dilué dans du PBS-BSA 2% sur la lamelle et recouvrir cette dernière d'un morceau de parafilm.
  - Laisser incuber l'anticorps 45 minutes à température ambiante en "mini-chambre" humide et noire.
  - Rincer deux fois 5 minutes au PBS.
  - Déposer une goutte de Mowiol, préalablement chauffé à 60°C, sur une lame porte-objet.
  - Prélever rapidement la lamelle couvre-objet et la retourner, côté cellules vers la lame porte-objet, sur la goutte de Mowiol. Presser légèrement.
  - Laisser polymériser le Mowiol au minimum 12 h à 4°C.

### **3.3.4 Marquage fluorescent des épitopes en surface cellulaire**

- Prélever la lamelle et rincer brièvement 3 fois dans du PBS-Ca 2 mM.
- Déposer la lamelle dans un puits de 1.9 cm<sup>2</sup> (boîte de 24 puits).
- Diluer l'anticorps primaire à la concentration optimale dans du DMEM -BSA 2%.
- Répartir 150 µl de la solution d'anticorps sur les lamelles.
- Incuber pendant 2 heures à 4°C.
- Rincer 2 fois 5 minutes au PBS à 4°C.
- Fixer les lamelles au PBS-PAF 4% pendant 10 minutes à 4°C.
- Rincer 2 fois 5 minutes au PBS.
- Diluer l'anticorps secondaire à une concentration idéale dans du DMEM-BSA 2%.

- Répartir 150  $\mu$ l de la solution d'anticorps secondaire par lamelle.
- Incuber 45 minutes à température ambiante dans une "mini-chambre humide" au noir.
- Rincer 2 fois 5 minutes au PBS.
- Monter les lamelles au Mowiol sur une lame porte-objet.
- Laisser polymériser le Mowiol au moins 12 heures à 4°C.

### **3.4 Microscopie à fluorescence**

#### **3.4.1 Microscopie non confocale**

Les observations sont réalisées au microscope inversé Zeiss Axiovert 135 TV équipé pour l'examen en épifluorescence et muni d'une caméra CCD refroidie.

L'excitation des particules fluorescentes se réalise au moyen d'une lampe 75W au Xénon et d'un cube comportant plusieurs jeux de filtres optiques. Dans le cadre de ce mémoire, deux jeux ont été utilisés. Pour l'observation de l'EGFP, il s'agit de la combinaison dite "FITC" qui comporte un filtre d'excitation de  $470 \pm 40$  nm, un miroir dichroïque de 505 nm et un filtre d'émission de  $535 \pm 45$  nm. Pour la visualisation de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594, c'est la combinaison "Texas Red" qui a été utilisée, à savoir un filtre d'excitation de  $560 \pm 40$  nm, un miroir dichroïque de 595 nm et un filtre d'émission de  $630 \pm 60$  nm. L'ensemble des observations a été réalisé avec un objectif à immersion Plan-Neofluar (Zeiss) 63 $\times$  et d'ouverture numérique 1.25.

Les images ont été enregistrées au moyen de la caméra CCD refroidie MicroMax 1300Y (Princeton Instruments) qui envoie directement des images digitalisées vers l'ordinateur. Ces images sont observées sur l'écran par l'intermédiaire du programme Metafluor (Universal Imaging) qui peut aussi les enregistrer sur le disque dur et servir à analyser certains paramètres de l'image. La caméra CCD refroidie accumule les photons dans des puits grillagés individuels durant un temps donné et numérise chaque signal local pour reconstituer l'image. Le temps d'acquisition est ajustable soit automatiquement, soit manuellement, ou peut être fixé. La résolution des images est de  $1300 \times 1300$  pixels, chaque pixel se situant sur une gamme de gris

de 12 bits. Lors de l'impression des images dans ce mémoire, la gamme de gris a été réduite à 8 bits (fichiers TIFF).

### **3.4.2 Microscopie confocale**

Les images en microscopie confocale ont été réalisées à l'aide du microscope LEICA TCS SP1. Ce microscope est équipé d'un laser Argon-Krypton. L'objectif est un HCX PLANAPO 63×.

L'EGFP couplée à la protéine Hyal2 a été excitée grâce à un filtre de 488 nm et son émission, détectée aux environs de 525 nm. Dans le cas des anticorps secondaires couplés à l'Alexa 594, l'excitation s'est effectuée à 568 nm et la zone de détection s'étendait de 600 à 650 nm.

L'image a été obtenue en moyennant les signaux de deux balayages successifs du champ cellulaire.

## 4 Résultats

Hyal2 est une hyaluronidase récemment découverte qui dégrade l'hyaluronan de manière partielle. Plusieurs éléments laissent penser que cette protéine possède un ancrage GPI dans la membrane plasmique et/ou dans d'autres membranes intra-cellulaires (Gillot, 1998). Sur base de ces éléments, le présent travail va s'attacher à mettre au point des outils qui permettent d'étudier et de préciser la localisation subcellulaire d'Hyal2. Ces outils sont des chimères EGFP-Hyal2.

Avant de passer à leur construction et à leur utilisation, une analyse complémentaire de la séquence en AA d'Hyal2 a été réalisée.

### 4.1 Analyse de la séquence en acides aminés d'Hyal2

Suite au développement de nouveaux programmes, il nous a paru important d'affiner l'analyse précédente (Gillot, 1998), particulièrement en ce qui concerne l'extrémité C-terminale de la protéine, qui sert de précurseur à une zone d'ancrage GPI probable.

#### 4.1.1 Informations disponibles dans les banques de données à propos d'Hyal2

La séquence de la protéine Hyal2 de *Rattus norvegicus*, clonée au laboratoire de Physiologie et Pharmacologie, a été introduite dans la banque de donnée TrEMBL (<http://www.expasy.ch>). Les informations pertinentes qui en découlent restent cependant limitées étant donné le peu de connaissances actuelles au sujet de la fonction et de la localisation cellulaire d'Hyal2. Dans les banques de données, les éléments qui sont considérés comme acceptés proviennent tous de l'article initial de Lepperdinger et al. (1998) décrivant le clonage et l'expression d'Hyal2 humaine et murine. Il y est déclaré qu'Hyal2 possède une fonction de dégradation partielle de l'hyaluronan de haut poids moléculaire et une localisation lysosomale. Nous savons que cette affirmation doit être nuancée (cf. INTRODUCTION).



### 4.1.2 Analyse supplémentaire de la séquence d'Hyal2

La séquence d'Hyal2 a été soumise au programme ScanProsite, également disponible sur le site "expasy". A partir d'une séquence d'AA, ScanProsite détermine des sites privilégiés probables (glycosylations, phosphorylations, etc.). Les principaux sites détectés dans la séquence d'Hyal2 sont résumés dans la **Fig. 4.1**. Nous n'avons pas tenu compte des nombreux sites potentiels de phosphorylation (par l'AMPc ou la PKC, par exemple) ou de myristoylation, vu leur haute probabilité de survenance.

#### 4.1.2.1 Sites de N-glycosylation

Dans des glycoprotéines, les sites potentiels de glycosylation sont spécifiques de la séquence consensus Asn – X – Ser/Thr – Y où X et Y sont n'importe quels acides aminés mis à part la proline (Ashford & Platt, 1999). Bien que la présence de ces sites consensus ne soit pas suffisante pour conclure que le résidu asparagine est glycosylé, car le repliement de la protéine joue un rôle important dans la régulation de la N-glycosylation (Pless & Lennarz, 1977), il est néanmoins utile de connaître le nombre (et éventuellement la position) des sites de glycosylation potentiels d'Hyal2.

Selon les programmes TrEMBL et Scanprosite, il semble établi que trois sites potentiels de N-glycosylation existent en position 74, 103 et 357 (cf. **Fig. 4.1**).

Dans un article récent, Fiszer-Szafarz et al. (2000) ont comparé les sites potentiels de glycosylation de toutes les hyaluronidases connues. Deux sites correspondant aux positions 103 et 357 d'Hyal2 de rat sont conservés ; la glycosylation de ces asparagines est donc hautement probable. Cet élément servira à l'interprétation des résultats de Western blots.

#### 4.1.2.2 Domaines EGF-like

Les domaines EGF-like sont des séquences découvertes dans l'EGF (Epidermal Growth Factor) qui contiennent six résidus cystéine, tous (du moins dans l'EGF) impliqués dans la création de ponts disulfures (Davis, 1990), selon la représentation schématique montrée à la

**Fig.4.2.** Ces séquences se retrouvent le plus souvent dans le domaine extracellulaire de protéines transmembranaires ou dans des protéines sécrétées. Elles sont importantes pour certaines interactions protéine-protéine. Des exemples de protéines contenant des domaines EGF-like sont les sélectines (Karp, 1998), certains facteurs de la coagulation, la perforine, la reelin, etc. Il existe également des protéines à ancrage GPI qui possèdent dans leur région C-terminale des domaines EGF-like, par exemple des protéines de surface de certains plasmodium (Burns et al., 2000; Patankar et al., 2000). La présence probable d'un domaine EGF-like dans Hyal2 est un argument supplémentaire en faveur d'une localisation en membrane plasmique ou d'une sécrétion.

#### **4.1.2.3 Détermination de la présence d'une ancre GPI**

Actuellement, deux programmes disponibles sur le réseau internet permettent à partir d'une séquence en acides aminés de prédire l'existence potentielle d'une ancre GPI (<http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/> et <http://129.194.186.123/GPI-anchor/>). L'ADNc d'Hyal2 a été introduit dans le programme de recherche de ces deux sites. Tous deux suggèrent effectivement une modification post-traductionnelle de type GPI avec comme site préférentiel de clivage ( $\omega$ ), l'AA 448 (cf. **Fig.4.1**). Le programme DGPI affine sa prédiction en mentionnant la présence d'un peptide signal de 19 AA en position N-terminale et d'un profil d'hydrophobicité correct de 20 AA en C-terminal.

L'hydrophobicité des parties N- et C-terminales d'Hyal2 est confirmée par un programme de prédiction de domaines transmembranaires (**Fig. 4.3**). Cependant, ces deux segments, clivés au niveau du réticulum endoplasmique, sont absents de la protéine mature.

#### **4.1.3 Modélisation tridimensionnelle**

Une modélisation tridimensionnelle de la protéine a pu être établie par le programme <http://www.fundp.ac.be/urbm/bioinfo/esypred/>, moyennant le clivage du peptide signal et de l'extrémité C-terminale. Cette structure intéressante est présentée dans la **Fig.4.4**.

Elle révèle un tonnelet de 7 brins  $\beta$  entouré d'hélices  $\alpha$ . Cette structure est fort semblable à celle de l'hyaluronidase de venin d'abeille, qui a été déterminée à une résolution de 1.6 Å après cristallisation (Markovic-Housley et al., 2000). Cette structure s'inscrit dans le modèle général de nombreuses glycosyl hydrolases comme le lysozyme, la  $\beta$ -amylase, la chitinase ou la cellobiohydrolase II (Henrissat et al., 1995). Par homologie avec l'hyaluronidase d'abeille, on peut penser que l' "orifice" formé par le tonnelet au sein d'Hyal2 (cf. Fig4.4B) n'est pas destiné à recevoir l'hyaluronan. Au contraire, celui-ci s'insérerait dans une large fente longitudinale perpendiculaire à l'axe du tonnelet. L'hyaluronidase d'abeille contient deux ponts disulfures, qui pourraient être conservés dans Hyal2. Quoi qu'il en soit, une étude structurale plus poussée d'Hyal2 serait intéressante, eu égard à sa spécificité d'action enzymatique si particulière (clivage partiel de l'hyaluronan).

#### 4.1.4 Conclusion

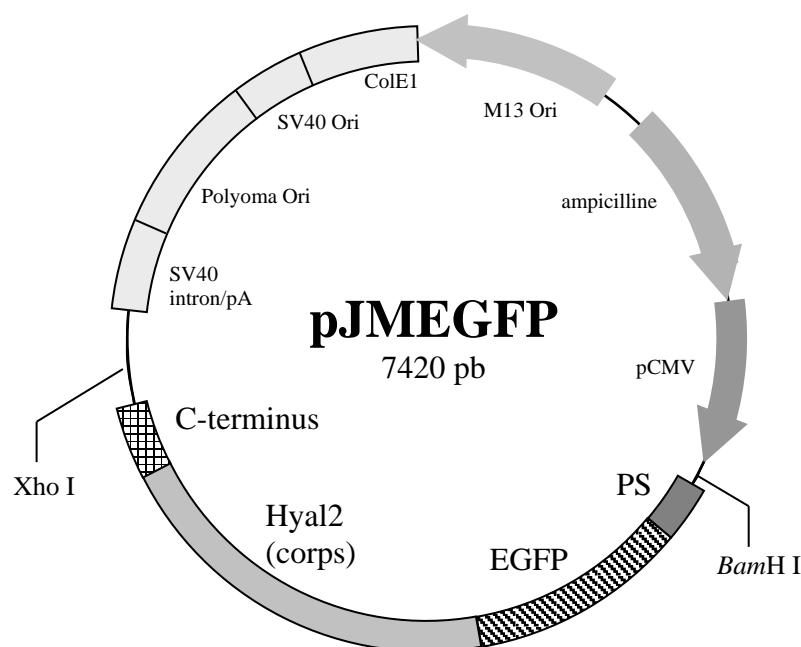
Cette analyse de la séquence d'Hyal2 conforte la conviction qu'elle contient effectivement des sites de glycosylation et une extrémité C-terminale de type GPI. Il est donc justifié de réaliser des chimères fluorescentes d'Hyal2 avec et sans son extrémité C-terminale, afin d'en déterminer les localisations subcellulaires. Une autre façon d'explorer le rôle de l'extrémité C-terminale serait de l'isoler du reste de la protéine et de la coupler directement à la GFP.

La découverte d'un domaine "EGF-like" dans la région C-terminale suggère une exposition extracellulaire de toute la molécule, soit en membrane plasmique, soit par sécrétion.

## 4.2 Construction de plasmides

### 4.2.1 Introduction : le plasmide pJMEGFP

Le plasmide pJMEGFP a été réalisé au laboratoire de Physiologie et Pharmacologie (Debacq, 1999). Ce plasmide est constitué du vecteur pcDNA I/Amp (4.8 Kb) de Invitrogen dans lequel a été introduit une chimère entre l'ADNc d'Hyal2 et celui codant pour la protéine fluorescente EGFP (**Fig.4.5**). Cet insert fut disposé dans le site multiple de clonage du vecteur entre les sites de restriction des enzymes *Bam*H I en amont et *Xho* I en aval de la phase ouverte de lecture. Ce plasmide code donc pour un hybride fluorescent d'Hyal2 qui conserve sa composante EGFP après le clivage du peptide signal et de l'extrémité C-terminale.

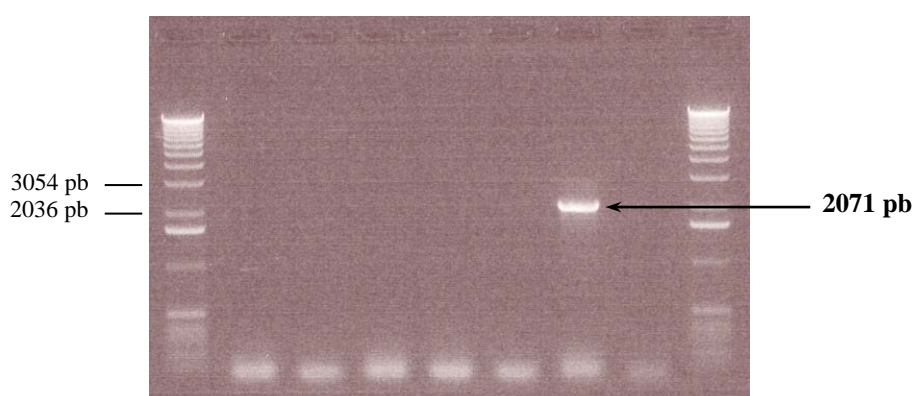


**Fig. 4.5.** Le plasmide pJMEGP.

### 4.2.2 La construction GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI

L'objectif est d'obtenir une chimère fluorescente d'Hyal2 déletée du segment hydrophobe C-terminal de 25 acides aminés précurseur de l'ancre GPI. Une telle protéine devrait donc être privée de son attache membranaire dans la cellule. La démarche suivie est résumée à la **Fig. 4.6**. Au départ du plasmide pJMEGFP, le fragment d'ADN désiré a été amplifié par PCR au moyen des amorces "s-BamHI" et "as-stopXhoI" (amorces dans le Tableau 3.1). Ces amorces sont destinées à introduire des sites de restriction de part et d'autre de cette séquence ainsi qu'un nouveau codon stop situé en amont des 81 pb codant pour l'ancre GPI probable.

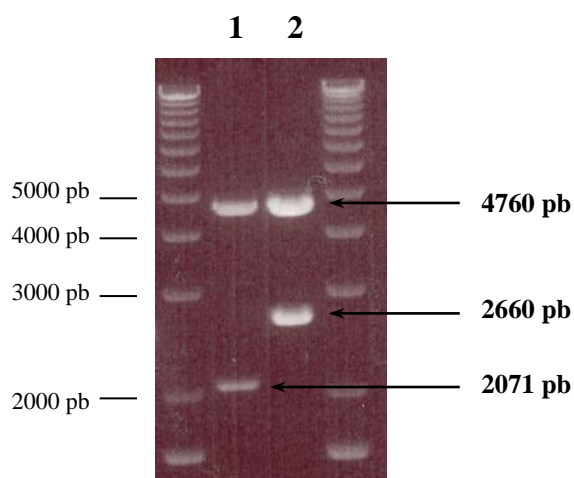
Le produit d'amplification et le plasmide pcDNA I/Amp ont tous deux été digérés par les enzymes *BamH* I et *Xho* I, puis purifiés et ligués. Le nouveau plasmide, appelé pcDNA-GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI, a été introduit dans des bactéries électrocompétentes TOP 10, permettant d'opérer une sélection sur milieu semi-solide de LB ampicilline. Une PCR sur différentes colonies a mis en évidence celles qui possédaient l'insert d'intérêt (**Fig. 4.7**). Dans le cas présent, 1 colonie sur les 11 analysées s'est révélée positive.



**Fig. 4.7.** Contrôle de la construction " GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI ". Migration sur gel d'agarose 1% du fragment amplifié par PCR à partir des amorces " s-BamHI " et " as-stopXhoI ". Une colonie sur 11 est positive.

Une maxipréparation a été ensuite réalisée sur cette colonie positive afin d'amplifier et de purifier le plasmide. Une restriction contrôle des plasmides pJMEGFP et pcDNA-GFP-Hyal2ΔGPI a été opérée par les enzymes *Bam*H I et *Xho* I (**Fig. 4.8**). Les fragments ont les tailles attendues : on retrouve le vecteur à ~4.8 kb, et on note une importante différence de taille entre les deux inserts (de 2.1 et 2.7 kb) : elle est expliquée par la présence de fragments de sites multiples de clonage entre les sites de restriction et l'insert dans le plasmide pJMEGFP (n°2 dans la **Fig. 4.8**).

Ensuite, plusieurs séquençages à l'aide des amorces "PB3", "PB11", "PB13", "PB 15", "T7", "SP6", "s-Forward EGFP", "as-Reverse EGFP" et "s2-EGFP" (amorces dans le Tableau 3.2) ont permis de confirmer que la phase ouverte de lecture était bien respectée dans la protéine GFP-Hyal2ΔGPI (résultats non montrés).



**Fig.4.8.** Migration sur gel d'agarose 1% des plasmides pcDNA-GFP-Hyal2ΔGPI (1) et pJMEGFP (2) digérés par *Bam*H I et *Xho* I.

### 4.2.3 La construction GFP-GPI

Cette construction a été réalisée en parallèle avec les différentes expériences de microscopie menées au moyen des deux premières protéines décrites.

Le but a été d'acquérir une protéine chimérique, constituée de l'EGFP fusionnée en C-terminal avec le segment peptidique précurseur de l'ancre GPI de la protéine Hyal2, tout en conservant le peptide signal d'Hyal2 en amont de l'EGFP. L'EGFP étant normalement soluble dans le cytoplasme et dans le noyau, la localisation cellulaire de la protéine hybride devrait donc être gouvernée uniquement par l'ancre GPI d'Hyal2. Cela permettra peut-être d'extrapoler la fonction de cette attache lipidique. Le plasmide destiné à obtenir la protéine GFP-GPI a été préparé comme schématisé à la **Fig. 4.9**.

Deux PCR ont d'abord été réalisées sur le plasmide pJMEGFP. La première, avec les amorces "s-BamHI" et "as-GPIAA", a produit le fragment "peptide signal-EGFP" encadré du site de restriction *BamH* I en 5' et des nucléotides 1429 à 1438 d'Hyal2 en 3' (les deux séquences additionnelles sont introduites par les amorces). La seconde PCR a formé la séquence entière de l'extrémité C-terminale hydrophobe d'Hyal2, bordée en 5' des 10 nucléotides terminaux (1386 à 1395) de l'EGFP et du site de restriction *Xho* I. Les deux produits PCR sont montrés à la **Fig. 4.10**.

Ces deux fragments ont ensuite été rassemblés. Cinq cycles PCR en absence d'amorces ont permis une hybridation des 2 fragments par leur extrémités complémentaires et la synthèse en 3' par la Taq DNA polymérase du brin absent (cf. **Fig.4.9**). Une PCR finale à l'aide des amorces "s-BamHI" et "as-XhoIGPI" amplifie le morceau entier final (cf. **Fig.4.9**). Ce fragment d'ADN est montré sur gel à la figure **Fig. 4.11**. La séquence de ce fragment "GFP-GPI" a été vérifiée. L'insert et le vecteur pcDNA I/Amp ont été digérés par les enzymes *BamH I* et *Xho I*, purifiés puis ligués (cf. **Fig.4.9**). Le mélange de ligation a été électroporé dans la souche de bactéries électrocompétentes TOP10.

Des bactéries sélectionnées par le milieu LB ampicilline, ont été testées par PCR avec les primers "Hyal 5SD" et "as-reverseEGFP" (**Fig. 4.12**). Quatre colonies positives sont découvertes. Cependant, cette partie du travail n'a pas pu être poussée plus loin étant donné les contraintes de temps. Il sera toutefois très intéressant d'observer, plus tard, la localisation subcellulaire de la chimère GFP-GPI.

#### 4.2.4 Conclusion

Les constructions pJMEGFP (codant pour Hyal2 avec son ancre GPI) et pcDNA-GFP-Hyal2ΔGPI (codant pour Hyal2 sans son ancre) ont été dûment vérifiées et sont maintenant disponibles pour leur transfection en parallèle dans des cellules COS-7. Dans la suite de ce travail, les protéines résultant de ces expressions seront appelées respectivement GFP-Hyal2 et GFP-Hyal2ΔGPI. Les paramètres essentiellement étudiés au cours de ce mémoire sont l'analyse par Western blot et l'observation en microscopie à fluorescence.

L'obtention du plasmide pcDNA-GFP-GPI (codant pour l'EGFP guidée par l'ancre d'Hyal2) n'a pas pu être terminée dans le cadre de ce mémoire. L'analyse de l'expression de la protéine GFP-GPI et son observation microscopique ne seront donc pas abordés.



## 4.3 Western blots

### 4.3.1 Introduction

Avant de procéder à l'examen en microscopie optique des différentes chimères fluorescentes d'Hyal2, il est nécessaire de vérifier leur bonne expression dans les cellules COS-7 transfectées. Grâce à la technique du Western blot, on peut également s'assurer que la protéine traduite possède un PM apparent compatible avec celui de la protéine Hyal2 native. Ainsi, la protéine GFP-Hyal2 devrait présenter un PM apparent équivalent à l'addition des PM de ses deux composants.

Pour réaliser les Western blots, le laboratoire dispose des anticorps suivants :

1. Un anticorps polyclonal de lapin anti-Hyal2. Cet anticorps, appelé p16, a été généré au laboratoire chez le lapin, au départ d'un peptide de 16 AA spécifique à Hyal2 de rat (**Fig. 4.13**). Parmi ces 16 AA, un seul est différent pour Hyal2 de souris et 3 le sont pour Hyal2 humaine. L'anticorps p16 reconnaît Hyal2 en Western blot et en immunoprécipitation.
2. Un anticorps polyclonal de lapin anti-GFP obtenu commercialement auprès de Santa Cruz Biotechnology. Cet anticorps détecte l'EGFP en Western blot, en immunoprécipitation et en immunocytochimie.

Les deux anticorps ont été utilisés au cours de ce travail. Sauf indication contraire, tous les gels ont été effectués avec 12 % de polyacrylamide.

### 4.3.2 Expression de GFP-Hyal2 et de GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI

L'expression de ces chimères a été évaluée 24 et 48 h après transfection des plasmides correspondants dans les cellules COS-7. L'équivalent de 6  $\mu$ g de protéines d'un homogénat de cellules transfectées et de cellules contrôles a été déposé sur gel et révélé par l'anticorps p16 anti-Hyal2. Les résultats sont montrés à la **Fig. 4.14**.

L'expression des deux protéines est déjà visible 24 h après la transfection, mais elle augmente nettement à 48 h. Une bande principale apparaît à un PM apparent d'environ 70 kDa pour GFP-Hyal2ΔGPI et à une taille légèrement supérieure pour GFP-Hyal2. La différence est discrète (quelques kDa) mais visible dans toutes les expériences réalisées. Elle est compatible avec l'absence d'ancrage GPI dans la protéine tronquée (~2 kDa). Notons que les PM sont donnés avec les réserves d'usage, étant donné le degré d'imprécision élevé des PM apparents des bandes de protéines standards et les dimensions de gel utilisées.

Pour GFP-Hyal2, une seconde bande spécifique se remarque à un PM clairement supérieur à la première. La bande supérieure est mieux visible à 48 h. La différence de PM entre les deux bandes est d'environ 10 à 15 kDa. Cependant, une bande équivalente n'apparaît pas en transfection de GFP-Hyal2ΔGPI.

On peut se poser de nombreuses questions sur la signification de la forme protéique de plus haut poids moléculaire (soit environ 80 à 85 kDa). Le minimum que l'on puisse affirmer est que l'apparition de cette forme nécessite la présence d'une extrémité C-terminale qui prélude à un ancrage GPI.

Suite à ce premier résultat, nous avons voulu savoir si un profil identique serait observé avec l'anticorps anti-GFP. Les résultats sont montrés à la **Fig.4.15**.

Pour GFP-Hyal2, les deux mêmes bandes décrites ci-dessus apparaissent dans le Western blot, bien que la bande supérieure soit nettement plus faible que l'inférieure. Leurs tailles semblent identiques à celles notées avec l'anticorps anti-Hyal2.

Par contre, pour GFP-Hyal2ΔGPI, une seconde bande se dessine, mais cette fois à un PM inférieur à la bande principale, déjà observée au moyen des anticorps anti-Hyal2. Il est étonnant d'observer, au moyen des anticorps anti-GFP, une bande qui n'est pas révélée par les anticorps anti-Hyal2. Il se pourrait qu'en absence d'ancrage GPI, la partie C-terminale d'Hyal2 où se situe le peptide antigénique (cf. Fig. 4.13) soit clivée dans une partie des protéines traduites, réduisant leur PM et faisant disparaître l'épitope des anticorps p16. Une autre explication possible serait un masquage de l'épitope des anticorps p16 associé à une absence de glycosylation (pour expliquer la réduction de taille). Seules des expériences supplémentaires pourraient faire progresser l'interprétation de ces résultats.

Il était convenu au départ que ce travail était surtout destiné à l'observation microscopique de chimères GFP. Cependant, au vu des résultats des premiers Western blots, il a semblé utile d'effectuer quelques expériences supplémentaires afin de répondre aux questions suivantes :

1. Les tailles apparentes des protéines observées en Western blot sont-elles compatibles avec les tailles réelles des protéines ?
2. La bande de 80 à 85 kDa détectée dans la construction GFP-Hyal2 serait-elle une forme glycosylée de la bande d'environ 70 kDa ?
3. Les différentes protéines chimériques sont-elles sécrétées dans le milieu extra-cellulaire ?

En dehors des deux plasmides utilisés jusqu'ici, le laboratoire possède deux constructions plasmidiques supplémentaires codant respectivement pour les protéines Hyal2 et Hyal2ΔGPI non couplées à l'EGFP. Leur utilisation en Western blot vise deux objectifs principaux : s'assurer que la présence de l'EGFP ne mène pas à l'apparition de bandes artéfactuelles, et déterminer si les différents PM observés sont en accord avec les PM prédits.

Un gel a été réalisé au moyen d'un homogénat de cellules transfectées par les 4 constructions et révélé à l'aide de l'anticorps anti-Hyal2 (**Fig. 4.16**). Pour les chimères possédant l'ancre GPI, fusionnées ou non à l'EGFP (pistes 2, 4 et 4'), deux bandes sont présentes, alors qu'une seule se distingue pour les transfections des cellules délétées de leur extrémité C-terminale (pistes 3 et 5). Cela confirme pleinement les résultats observés précédemment avec les protéines liées à l'EGFP. Pour les deux protéines non liées à l'EGFP, on constate un déplacement des bandes vers le bas du gel. Ce déplacement correspond à une différence de PM apparent d'environ 25 kDa. Cette différence est légèrement inférieure au PM réel de l'EGFP (~27 kDa). Cependant, ces déductions sont faites sur un gel de petites dimensions, et comme la migration des protéines à travers le gel de polyacrylamide est logarithmique, un tassement des protéines dans le haut du gel peut se présenter.

On peut donc conclure que les constructions contenant l'EGFP sont exprimées de façon correcte par comparaison aux constructions d'Hyal2 sans l'EGFP.

La deuxième question était de savoir si la bande supérieure observée dans les chimères possédant l'ancre GPI (avec ou sans EGFP) était une forme N-glycosylée de la bande inférieure. Pour y répondre, des homogénats des cellules transfectées par les 4 constructions ont

été traités à l'endoglycosidase-F, une enzyme qui coupe le N-glycan (**Fig. 4.17 A et B**). On observe que la totalité des bandes se déplacent vers le bas d'un PM d'environ 6 kDa (dans la Fig. 4.17A, comparer les pistes 1 à 2, 3 à 4, 5 à 6, et 7 à 8). Une structure N-glycan a un PM approximatif de 2 kDa. La différence de PM entre les bandes protéiques traitées ou non à l'endoglycosidase-F pourrait donc correspondre à trois N-glycosylations, comme mentionné dans la prédiction du programme Prosite (cf. analyse de la séquence d'Hyal2). On peut conclure, au vu de ces résultats, que toutes les bandes révélées sur le Western blot sont des formes N-glycosylées, et qu'il ne semble pas y avoir de différence notable de glycosylation d'un type de protéine à l'autre, avec ou sans l'EGFP.

Ces conclusions sont également valables pour le Western blot réalisé avec l'anticorps anti-GFP, y compris pour la bande de PM inférieure qui n'est décelée qu'avec cet anticorps et la protéine GFP-Hyal2ΔGPI (pistes 7 et 8 de la Fig. 4.17B).

Pour faciliter l'interprétation des PM apparents, il faut se référer au **Tableau 4.1**, qui présente les PM calculés des différents fragments. Il s'avère très difficile d'interpréter les valeurs des PM apparents des diverses bandes en fonction des PM prédits. Les formes déglycosylées d'Hyal2 (bande principale) et d'Hyal2ΔGPI (bande unique) présentent un PM inférieur d'environ 6 kDa au PM prédit pour leur séquence en AA ± GPI (tenant compte du clivage de peptide signal N-terminal). Les formes déglycosylées des constructions avec GFP présentent un PM apparent inférieur de 12 kDa au PM prédit. Ces différences sont difficilement explicables, sauf s'il s'agit d'imprécisions dans la détermination des PM sur les gels.

**Tableau 4.1.** PM des différentes protéines et fragments construits au départ d'Hyal2. Les PM sont calculés avec le programme PeptideMass disponible sur le site : <http://us.expasy.org/tools/peptide-mass>. Les glycosylations potentielles ne sont pas prises en compte.

Fragment ou protéine	Chimère potentiellement exprimée dans les cellules	PM prédit (kDa)	PM apparents observés après déglycosylation (Fig. 4.17)
Précurseur Hyal2		54.0	
Hyal2 sans PS et sans extrémité C-terminale	Hyal2ΔGPI	49.1	43
Peptide signal N-terminal		2.0	
Extrémité C-terminale hydrophobe		2.6	
Ancre GPI (taille moyenne)		2.0	
Précurseur Hyal2 sans PS et avec ancre GPI	Hyal2	51.4	62 et 45
EGFP		26.8	
	GFP-Hyal2	78.2	78 et 66
	GFP-Hyal2ΔGPI	75.9	64

Le dernier point abordé en relation avec les Western blots était la sécrétion des différentes constructions dans le milieu extracellulaire. Les milieux de culture des cellules transfectées exprimant les 4 chimères (Hyal2, Hyal2 $\Delta$ GPI, GFP-Hyal2 et GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI) ont été privés de sérum foetal pendant les 24 h qui précédaient leur récolte. Quarante-huit heures après transfection, les milieux ont été prélevés. Ils ont ensuite été centrifugés pour éliminer les débris cellulaires éventuels et concentrés. Un volume identique a été déposé par puits. Le Western blot a été révélé au moyen des anticorps anti-Hyal2 (**Fig. 4.18**).

On constate une nette augmentation du taux de sécrétion pour les constructions délétées de leur extrémité C-terminale, avec ou sans EGFP (pistes 3 et 5 de la Fig. 4.18). Cette différence est accentuée pour les protéines non couplées à l'EGFP : aucune sécrétion n'est observée pour la protéine Hyal2 (comparer les pistes 4 et 5). Pour EGFP-Hyal2, seule la bande principale est visible (cf. Fig. 4.16 pour les extraits cellulaires correspondants). La taille des protéines sécrétées est très proche, ou identique, à celle des protéines détectées dans les homogénats cellulaires.

On peut donc prétendre que l'ancrage GPI joue un rôle dans la rétention cellulaire de la protéine Hyal2 et que son absence favorise sa sécrétion dans le milieu environnant. Il faut aussi conclure qu'une partie des molécules d'Hyal2 "sauvages" est sécrétée.

### 4.3.3 Conclusion

En résumé, les Western blots ont montré que les chimères d'Hyal2 liés à l'EGFP étaient correctement exprimées dans les cellules COS-7 et que toutes les bandes protéiques observées étaient N-glycosylées dans les mêmes proportions (d'environ 6 kDa par protéine). L'absence d'ancrage GPI favorise la sécrétion d'Hyal2 dans le milieu extracellulaire. L'élément le plus étonnant est la présence de 2 bandes protéiques pour une même construction, alors que ce dédoublement ne s'explique pas par une N-glycosylation. De plus, dans un cas particulier, l'anticorps anti-EGFP reconnaît une bande non décelée par l'anticorps anti-Hyal2.

## **4.4 Observation microscopique des constructions**

### **4.4.1 Expériences préliminaires**

Les conditions optimales de transfection et d'observation microscopique ont d'abord été déterminées, le but étant d'observer à la fois la fluorescence de l'EGFP (émission verte) et celle d'anticorps secondaires couplés à l'Alexa-594 (émission rouge). Il s'est rapidement avéré que seules quelques petites modifications des conditions de transfection utilisées précédemment (Gillot, 1998) seraient nécessaires.

Dans toutes les expériences présentées, les conditions suivantes ont été utilisées :

- Ensemencement à 50.000 cellules par puits de 9.6 cm<sup>2</sup> dans le fond duquel sont préalablement déposées deux lamelles en verre de 1.5 cm de diamètre.
- Transfection, 24 h plus tard, au moyen de Fugène-6 (Roche) à raison de 0.7 µg d'ADN et de 6 µl de lipides par puits.
- Observation microscopique en général après 24 h. En effet, bien que l'expression des protéines en Western blot soit plus importante à 48 qu'à 24 h, l'observation microscopique est pratiquement identique dans les deux cas. L'image fluorescente régresse toutefois à partir de 72 h (voir plus loin dans les résultats).

L'observation a été réalisée à frais ou après fixation. Les conditions de cette dernière ont dû être ajustées. Ainsi les fixations au méthanol (le méthanol fixe et perméabilise les cellules) ou au PAF/méthanol, malgré leur facilité d'utilisation, n'ont pas pu être retenues en raison de l'aspect dégradé des cellules. La condition de fixation choisie est finalement le PAF 4% pendant 10 minutes.

Après fixation, les cellules ont été observées soit directement, soit après une perméabilisation au Triton X-100. L'anticorps est ensuite ajouté. Les étapes qui suivent la fixation diminuent drastiquement la fluorescence de l'EGFP exprimée dans les cellules. Ces difficultés de détection n'ont pu être complètement résolues malgré plusieurs modifications du protocole de perméabilisation au Triton X-100.

### 4.4.2 Validité du couplage à l'EGFP

Dans un premier temps, la question posée était de savoir si les protéines couplées ou non à l'EGFP possédaient une localisation intracellulaire identique.

Ainsi les 4 protéines ont été exprimées dans les cellules COS-7 après transfection de leur plasmide au Fugène. Les cellules ont ensuite subi un marquage à l'anticorps anti-Hyal2 et une détection par anticorps secondaire couplé à l'Alexa-594. Les observations réalisées au microscope confocal sont visibles à la **Fig. 4.19**. Dans les quatre situations, l'image cellulaire est assez semblable. Un réseau réticulaire autour du noyau se distingue dans les cellules. La membrane plasmique n'est pas visible.

D'une part, ces résultats sont satisfaisants puisque le couplage à l'EGFP ne modifie pas la localisation subcellulaire des protéines recombinantes. D'autre part, les images des protéines avec ou sans leur ancre GPI paraissent semblables, ce qui pourrait laisser présager que l'ancre GPI n'influence pas la localisation intracellulaire d'Hyal2. Cependant ces impressions seront modifiées lors de l'observation de la fluorescence de l'EGFP elle-même.

### 4.4.3 Observation des cellules sans fixation

Une des applications les plus intéressantes des protéines fusionnées à l'EGFP est l'étude de leur localisation, de leur dynamique et de leur trajectoire subcellulaire dans des cellules vivantes, observées au microscope sans fixation préalable.

Cet outil a évidemment été utilisé. Des cellules COS-7 exprimant GFP-Hyal2 et GFP-Hyal2ΔGPI ont ainsi été observées en temps réel et à température ambiante, 24 h après transfection (**Fig. 4.20**).

Contrairement aux observations avec les anticorps, les images de la fluorescence de l'EGFP sans fixation montrent des différences marquantes entre les deux types de protéines, avec ou sans ancre GPI.

La fluorescence de GFP-Hyal2 (A dans la **Fig. 4.20**) provient de plusieurs zones cellulaires distinctes :

- Le contour du noyau est souligné.
- Un fin réseau réticulaire en partance du noyau s'étend dans le cytoplasme ; il s'agit vraisemblablement du réticulum endoplasmique.
- Une zone nettement plus fluorescente constituée de plusieurs amas hétérogènes est accolée au noyau. Cette zone est parfois moins marquée dans certaines cellules ; elle pourrait représenter le Golgi ou une partie de celui-ci.
- La membrane plasmique est nettement visible comme l'indique la netteté du contour cellulaire.
- De petites vésicules fluorescentes parsèment le cytoplasme. Le déplacement de ces vésicules a pu être observé pendant un certain temps (**Fig. 4.21**). Certaines vésicules effectuent des mouvements parfois assez rapides, en partie linéaires, sur des distances de plusieurs microns. Une observation à la température idéale de 37°C aurait peut-être permis de rendre compte d'une vitesse et/ou d'une destination cellulaire plus physiologique. Le déplacement de vésicules marquées par des sondes fluorescentes est une observation courante en microscopie à fluorescence à haute résolution. Il peut s'agir entre autres de vésicules de sécrétion ou de cargos destinés à transporter du matériel protéique entre le RE, le Golgi et la membrane plasmique. Le déplacement de telles vésicules s'effectue généralement le long de microtubules.

Dans le cas de GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI (**Fig. 4.20B**), une large zone réticulaire se distingue tout autour du noyau avec une bande plus intense au centre. Il existe plusieurs différences avec l'image précédente :

1. l'image réticulaire est plus intense : elle ressemble plus à un "nid d'abeilles";
2. le contour cellulaire n'est pas discernable ;
3. les vésicules fluorescentes sont pratiquement absentes ;
4. il n'y a pas de zone focale de forte fluorescence accolée au noyau.



En conclusion, contrairement à l'expérience précédente au moyen des anticorps, l'observation de la fluorescence de l'EGFP révèle plusieurs différences entre les cellules exprimant Hyal2 et Hyal2ΔGPI. Ces modifications apparaissent essentiellement à trois endroits : au niveau du réseau réticulaire (plus intense pour Hyal2ΔGPI), de la "tache" décentrée près du noyau (plus marquée pour Hyal2) et de la membrane plasmique (révélée uniquement pour Hyal2). Une première hypothèse est que les deux chimères séjournent longtemps dans le RE, que la protéine tronquée de son ancre y séjourne exclusivement, et qu'Hyal2 "intacte" se retrouve aussi en quantité détectable dans le Golgi (ou le trans-Golgi) et la membrane plasmique.

Il serait intéressant de confirmer ces observations par des colocalisations d'autres protéines (du RE et du Golgi par exemple) et par une recherche de molécules d'Hyal2 sur la membrane plasmique. Pour cela, des expériences au moyen d'anticorps sont nécessaires.

#### **4.4.4 Observations des cellules fixées au paraformaldéhyde**

Dans les expériences de marquage immunocytochimique, une fixation au paraformaldéhyde (PAF) est nécessaire. Il nous semblait donc utile de déterminer si la fixation modifiait les images fluorescentes d'Hyal2 obtenues par l'intermédiaire de la GFP. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence à haute résolution (**Fig. 4.22**) ainsi qu'au microscope confocal (**Fig. 4.23**).

Les images sont assez semblables à celles saisies sans fixation et semblent confirmer les différences déjà identifiées entre les deux chimères. Au microscope confocal, la présence de vésicules et l'accentuation d'une zone périnucléaire sont bien visibles pour l'EGFP-Hyal2. Le bord cellulaire est également mieux observé au microscope confocal pour cette construction.

#### 4.4.5 Marquage immunocytochimique de la calréticuline

Afin d'apporter une confirmation sur la nature du réseau réticulaire mis en évidence dans la totalité des cellules exprimant les chimères entre Hyal2 et le GFP, un marquage immunocytochimique de la calréticuline a été réalisé. La calréticuline est la protéine principale liant le calcium présente dans les membranes du réticulum sarcoplasmique des muscles lisses et du RE des cellules non musculaires. Un anticorps anti-calréticuline humaine polyclonal dressé chez le lapin a été choisi (Affinity Bioreagents), car cet anticorps détecte son épitope dans les cellules COS-7. L'anticorps anti-calréticuline a été utilisé à une concentration de 1/500 puis révélé grâce à un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin, couplé à l'Alexa 594 (émission dans le rouge). L'observation au microscope confocal des cellules transfectées est montrée à la **Fig. 4.24**.

La majorité des molécules d'EGFP semble colocalisée avec la calréticuline, c'est-à-dire dans le RE. C'est particulièrement frappant pour la protéine GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI. En ce qui concerne la protéine non tronquée, une zone fluorescente non localisée dans le RE apparaît nettement près du noyau. D'autres vésicules, d'endocytose par exemple, contenant GFP-Hyal2 pourraient être également présentes dans la cellule en dehors du RE.

#### 4.4.6 Marquage immunocytochimique du récepteur du mannose-6 phosphate

Dans un objectif similaire, une observation simultanée des chimères GFP d'une part et de la fixation de l'anticorps anti-récepteur au mannose-6 phosphate (M6PR) de l'autre a été réalisée. Le M6PR est une protéine membranaire intrinsèque présente dans le réseau trans-Golgi et dans des vésicules de transport issues de ce réseau (endosomes secondaires). Le but poursuivi était de déterminer la nature de la zone plus fluorescente juxtaposée au noyau.

Les images obtenues (**Fig. 4.25**) sont assez illustratives. Le M6PR se localise dans des zones vésiculaires avec un rassemblement périnucléaire plus important qui représente vraisemblablement le trans-Golgi. La protéine GFP-Hyal2 se colocalise de façon très nette avec le M6PR, surtout dans la zone périnucléaire. En revanche, GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI montre très peu de superposition avec le M6PR, en particulier dans le trans-Golgi. Ces images immunocytochimiques confirment une différence partielle de localisation entre les deux types de chimères.

La protéine GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI ne résiderait donc pas dans le réseau trans-Golgi, contrairement à GFP-Hyal2, dont une partie des molécules serait localisée dans le réseau trans-Golgi ou dans les endosomes secondaires. Il serait intéressant de réaliser un marquage immunocytochimique supplémentaire qui permettrait de distinguer ces deux constituants cellulaires.

#### 4.4.7 Traitement des cellules à la bréfeldine

La bréfeldine est une molécule qui perturbe la structure et la fonction du Golgi, forçant les molécules à rejoindre le RE. Cette expérience visait donc à confirmer la nature de la tache fluorescente près du noyau.

Les cellules exprimant GFP-Hyal2 et GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI ont été traitées 30 minutes par 5  $\mu$ g/ml de bréfeldine et ensuite fixées au PAF (**Fig. 4.26**). Les images des cellules contenant la GFP-Hyal2 semblent modifiées après le traitement. La “tache” paraît s’effacer et la fluorescence du RE s’intensifie. En revanche, la fluorescence des cellules contenant la protéine tronquée de son attache GPI ne montre pas de changement notable.

Ces observations continuent à soutenir l’hypothèse selon laquelle une partie des protéines GFP-Hyal2, mais pas des protéines GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI, se trouverait dans le réseau trans-Golgi. De plus, elles vont à l’encontre de l’hypothèse selon laquelle le rassemblement des molécules GFP-Hyal2 près du noyau constituerait un “ aggrésome ”, structure où s’accumule un excédent de molécules destinées à être digérées par le protéasome (Kopito, 2000).

#### 4.4.8 Traitement des cellules à la cycloheximide

La cycloheximide est une substance qui inhibe la peptidyl transférase, enzyme qui catalyse le transfert de la chaîne polypeptidique naissante depuis l'ARNt au site P jusqu'à l'aminocyl-ARNt au site A, lors de l'étape d'élongation des protéines. La cycloheximide empêche donc la synthèse des protéines. L'idée d'un traitement à la cycloheximide préalable à l'observation microscopique est de dégorger le réticulum endoplasmique et/ou le Golgi afin de mieux observer d'autres localisations de la protéine d'intérêt.

Les cellules exprimant les constructions GFP-Hyal2 et GFP-Hyal2ΔGPI ont été traitées à la cycloheximide 10 µg/ml pendant 3 et 5 heures (**Fig. 4.27**). Cette concentration est connue pour inhiber quasi complètement la synthèse des protéines dans les cellules COS-7. Or, dans l'ensemble, ce traitement n'a pas modifié de façon spectaculaire la localisation de la fluorescence. Cependant, on peut constater que le niveau global de fluorescence ne diminue guère (sauf dans un cas après 3 heures de cycloheximide pour l'EGFP-Hyal2). L'arrivée de molécules néosynthétisées n'est donc peut-être pas suffisamment réduite par rapport au pool existant. On remarque toutefois, pour l'EGFP-Hyal2, que plusieurs cellules présentent une accentuation du contour cellulaire après 5 heures de traitement à la cycloheximide (**Fig. 4.27'**). Cette observation est compatible avec l'hypothèse proposée jusqu'ici, mais elle n'est pas suffisante pour tirer des conclusions probantes. D'autres expériences destinées à prouver l'efficacité de la cycloheximide dans ces conditions, et à étudier le turnover de GFP-Hyal2, seraient requises avant de conclure à un trafic d'Hyal2 vers la membrane plasmique et à une résidence significative de l'enzyme à cet endroit.

#### 4.4.9 Observation des cellules à différents moments après la transfection

Dans un objectif similaire, mais en adoptant une méthode moins radicale que l'arrêt de synthèse des protéines, on peut proposer de suivre l'évolution de la localisation cellulaire de GFP-Hyal2 et de GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI durant plusieurs jours après une transfection, jusqu'à un désengorgement éventuel du RE. Les résultats de cette expérience (**Fig. 4.28**) montrent, pour les deux hybrides, une disparition progressive de l'image fluorescente réticulaire. Dans les cellules exprimant EGFP-Hyal2, 72 heures après la transfection, la zone périnucléaire n'est pas plus accentuée, mais le contour cellulaire reste bien net. Il est toutefois difficile, sur base de ces expériences, de tirer des conclusions sur le déplacement quantitatif des protéines migrant d'un endroit à l'autre de la cellule. Il faut aussi signaler que des observations à des temps plus long (96 et 120 h) n'ont pas été possibles suite à l'apparition de signes de souffrance cellulaire marqués.

#### 4.4.10 Marquage immunocytochimique en surface cellulaire

Comme évoqué précédemment, une différence notable entre les cellules exprimant les protéines GFP-Hyal2 et GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI est la mise en évidence du contour cellulaire dans le premier cas. Pour approfondir cette question et s'assurer qu'il s'agissait réellement d'une localisation de Hyal2 en membrane plasmique, un marquage immunocytochimique en surface cellulaire a été tenté.

Les anticorps anti-Hyal2 (1/500) ont été mis au contact des cellules maintenues à 4°C pendant 2 h. Les cellules ont été ensuite rincées, fixées et exposées à l'anticorps secondaire sans perméabilisation. Il faut préciser qu'une fixation préalable à l'ajout de l'anticorps primaire, même sans étape de perméabilisation au Triton, a laissé apparaître une pénétration d'anticorps dans la cellule, c'est pourquoi la technique de mise en contact à froid a été préférée.

Comme le montre la **Fig. 4.29**, aucun signal provenant des anticorps anti-Hyal2 n'est détecté à la surface des cellules qui expriment EGFP-Hyal2 ou EGFP-Hyal2ΔGPI de façon correcte, comme le prouve la fluorescence de l'EGFP.

L'expérience a été recommencée en diminuant la dilution de l'anticorps primaire à 1/100, mais les résultats étaient inchangés (figures non montrées). Afin de vérifier ces observations, des expériences similaires ont été réalisées au moyen d'anticorps anti-GFP. Tout d'abord, il fallait démontrer l'efficacité en immunocytochimie de ces anticorps. Cela est présenté dans la **Fig. 4.30**. L'anticorps anti-GFP, à une concentration de 1/100, permet de révéler la protéine intracellulaire de façon aussi efficace que l'anticorps anti-Hyal2 (cf. **Fig. 4.19**).

Les anticorps anti-GFP ont donc été utilisés pour rechercher une localisation en membrane plasmique de Hyal2 (**Fig. 4.31**). Cette expérience a révélé une différence de comportement frappante entre les deux chimères. Seules les cellules exprimant GFP-Hyal2 présentent un marquage manifeste à la surface externe. Ce marquage n'est pas uniforme ; tout au contraire, il est fait d'une multitude de points lumineux distincts. On peut imaginer que ces points représentent un "clustering" de molécules à attache GPI suite à l'effet des anticorps primaires et secondaires, comme proposé dans la littérature (Friedrichson & Kurzchalia, 1998).

Afin de confirmer ces résultats, des observations supplémentaires ont été réalisées au microscope confocal (**Fig. 4.32**). Ces images apportent la certitude d'une présence à la membrane plasmique de la construction GFP-Hyal2 possédant une extrémité C-terminale intacte, contrairement à la chimère tronquée de son attache GPI.

Finalement, à la suite de ces observations, il a paru intéressant de tenter de libérer les molécules de la membrane plasmique au moyen de la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC). Il s'agit d'une enzyme qui clive le phosphatidylinositol dans les membranes intactes et libère ainsi la protéine de son ancre GPI. Les cellules contenant les deux constructions ont été traitées à la PI-PLC (1 unité/ml pendant 16 h) dans le but de libérer les protéines détectées dans les cellules exprimant GFP-Hyal2. Par après, un marquage en surface

cellulaire aux anticorps anti-EGFP a été réalisé. Cependant, aucune différence entre les cellules traitées ou non à la PI-PLC n'a pu être observée. Dans ces expériences clairement préliminaires, il est possible que la concentration en PI-PLC n'ait pas été optimale, que la sensibilité de la méthode soit insuffisante, ou que les protéines Hyal2 ne soient pas attachées en membrane plasmique par une ancre GPI sensible à la PI-PLC. Seules des expériences supplémentaires permettraient de distinguer ces possibilités.

#### **4.4.11 Conclusion**

En résumé, les observations microscopiques des cellules exprimant GFP-Hyal2 ou GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI ont prouvé que la GFP était un outil moléculaire très sensible pour distinguer des différences de localisation subcellulaire entre les chimères, alors que les anticorps anti-Hyal2 disponibles le permettaient à peine, ou pas du tout. En particulier, l'observation des cellules sans fixation, bien que réalisée dans des conditions techniques simples (température ambiante), a donné des images très parlantes. Lorsqu'on ajoute ces observations à l'examen simultané de la fluorescence de la GFP et de celle liée aux anticorps anti-calréticuline et anti-M6PR, il apparaît qu'Hyal2 sauvage séjourne de façon significative dans le réseau trans-Golgi (ou dans des endosomes rassemblés près du noyau) et dans la membrane plasmique, en plus d'une résidence non négligeable dans le RE. Privée de son ancre GPI, Hyal2 est retenue uniquement dans le RE, une observation déjà relevée dans le trypanosome pour d'autres protéines tronquées de la même façon (McDowell et al., 1998).

Les expériences réalisées avec la bréfeldine et la cycloheximide doivent être considérées comme préliminaires, bien que leurs résultats soient compatibles avec les suggestions ci-dessus. La détection d'Hyal2 dans le feuillet externe de la membrane plasmique au moyen des anticorps anti-GFP (avec GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI comme contrôle négatif) est spectaculaire (cf. Figs. 4.31 et 4.32), allant jusqu'à suggérer un "clustering" typique des molécules à ancre GPI dans des microdomaines riches en cholestérol. Cette observation devrait être confirmée par d'autres techniques.



## 5 Discussion et perspectives

Hyal2 est une hyaluronidase qui transforme l'hyaluronan de haut poids moléculaire en fragments de taille intermédiaire (~20 kDa). Ceux-ci possèdent alors des propriétés biologiques spécifiques, notamment l'activation de cellules des défenses immunitaires tels que les macrophages, les cellules dendritiques, etc. (Noble, 2002).

Afin de mieux comprendre ces événements, il est crucial de découvrir la localisation subcellulaire d'Hyal2, dont la structure en AA laisse présager l'existence d'un ancrage GPI. Cependant, la très faible expression endogène d'Hyal2 dans différents tissus et types cellulaires explorés nous a amenés à privilégier une approche microscopique basée sur la construction de chimères fluorescentes d'Hyal2 privés ou non de leur ancre GPI.

### **Analyse de la séquence d'Hyal2 : confirmation de la présence d'une ancre GPI**

Avant de débiter les expériences cellulaires, une analyse informatique de la séquence d'Hyal2 a été effectuée. Deux programmes différents disponibles à partir du site "Expasy" prédisent avec une forte probabilité la présence d'une extrémité C-terminale destinée à être clivée et remplacée par une ancre GPI. De plus, le site de clivage mentionné (AA 448) est identique dans les deux prédictions. Hyal2 serait donc bien une enzyme liée aux membranes cellulaires, vraisemblablement à la membrane plasmique, comme la majorité des protéines à ancre GPI, mais sans exclure d'autres membranes intracellulaires. Des preuves biochimiques devraient confirmer complètement cette prédiction.

Les résultats de l'analyse informatique confortent également notre opinion de départ à propos de la présence vraisemblable de trois sites de N-glycosylation. Ceux-ci pourraient être importants pour sa localisation ou sa fonction. On sait que de nombreuses protéines à ancre GPI sont dirigées, dans les cellules polarisées, vers la membrane plasmique apicale grâce aux N-glycosylations (Berting et al, 1999).

Enfin, l'analyse a révélé la présence d'un domaine EGF-like situé en partie C-terminale de la protéine. L'existence de ce domaine est un argument supplémentaire signant un logement en membrane plasmique et/ou une sécrétion.

### **Expression d'Hyal2 examinée par Western blots : suggestion de modifications post-traductionnelles inhabituelles**

Tout d'abord, les Western blots ont permis de confirmer la bonne expression de toutes les protéines hybrides utilisées. De plus, la possibilité d'employer deux anticorps différents pour détecter les chimères EGFP-Hyal2 a conduit à des observations intéressantes. Rappelons que l'anticorps anti-GFP détecte son ou ses épitopes dans la partie N-terminale des protéines chimériques, et que l'anticorps anti-Hyal2 reconnaît 16 AA proches de l'extrémité C-terminale des chimères.

Les deux anticorps révèlent le même profil protéique dans le cas des cellules exprimant GFP-Hyal2, soit une bande principale aux alentours de 70 kDa et une autre, moins marquée, autour de 80 kDa. Si la bande principale correspond à la protéine issue immédiatement de la traduction et de la maturation intracellulaire (après clivage du peptide signal et remplacement de l'extrémité C-terminale hydrophobe par l'ancre GPI), la bande supérieure équivaldrait à cette même protéine additionnée d'un composant de 10 à 15 kDa. Or, tous les échantillons ont été traités au SDS et au  $\beta$ -mercaptoéthanol qui, de concert, déplient la protéine et rompent l'ensemble des ponts disulfures et hydrogènes. Ce fragment supplémentaire ne pourrait-il donc être lié à la protéine que de manière covalente ?

Deux hypothèses peuvent être avancées quant à la nature de ce composant. Post-traductionnellement, un peptide pourrait s'attacher par un lien covalent à la protéine. La deuxième supposition serait la présence de O-glycosylations. Une O-glycosylation peut être composée d'un à plusieurs centaines de résidus saccharidiques, ce qui pourrait expliquer la différence de PM observée entre les deux bandes (Ashford et Platt, 1999). Il pourrait donc être intéressant de traiter les échantillons à l'hydrazine, une enzyme qui clive les O-glycosylations. Il est étonnant que, avec ou sans EGFP, une privation de l'extrémité C-terminale d'Hyal2 empêche la modification post-traductionnelle qui crée une bande de PM supérieur, puisque celle-ci n'apparaît pas pour les constructions GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI et Hyal2 $\Delta$ GPI.

Une autre constatation assez troublante est l'apparition d'une bande supplémentaire (mais de PM inférieur) pour la construction GFP-Hyal2 $\Delta$ GPI lors de la révélation par l'anticorps anti-GFP mais pas par l'anticorps anti-Hyal2. L'absence d'extrémité C-terminale pourrait donc encourager le clivage d'Hyal2 entre les épitopes des anticorps anti-Hyal2 et anti-GFP, du moins pour une fraction des protéines. Afin de confirmer cette hypothèse, plusieurs solutions sont envisageables : tout d'abord, le développement d'un autre anticorps

anti-Hyal2 spécifique d'un épitope situé dans une partie plus proximale de la molécule. Un autre procédé pourrait être la migration de la protéine sur un gel en deux dimensions suivi d'une extraction et d'une purification de la tâche désirée. La protéine pourra alors subir un séquençage selon la technique d'Edman ou une analyse en spectrophotométrie de masse.

Finalement, le traitement des échantillons à l'endoglycosidase F a permis d'affirmer que toutes les bandes observées présentent des N-glycosylations. L'hypothèse selon laquelle la différence de PM des bandes exposées dans la construction GFP-Hyal2 serait expliquée par cette modification post-traductionnelle doit donc être rejetée.

### **Présence d'Hyal2 dans les milieux extracellulaires**

Des Western blots pratiqués sur les milieux de cultures ont révélé la présence d'Hyal2 ou de GFP-Hyal2, même lorsque les chimères comprenaient une ancre GPI. Cependant, une nette augmentation de la sécrétion se remarque pour les constructions délétées de leur extrémité C-terminale. Ceci pourrait laisser présager que l'ancre GPI aurait pour fonction de retenir les protéines dans la cellule, mais pas complètement. Le fait qu'une faible bande sécrétée soit visible dans la construction GFP-Hyal2, mais pas dans la construction non couplée à l'EGFP, peut laisser penser que la fusion à l'EGFP modifierait quelque peu les propriétés d'Hyal2 et accentuerait la sécrétion. Celle-ci est peut-être quasi absente en situation physiologique. Néanmoins, l'interprétation des Western blots sur les milieux extracellulaires doit être tempérée par le fait que les taux d'expression dans les extraits cellulaires correspondants n'étaient pas strictement équivalents (**Fig. 4.16**). Pour la même raison, il est également difficile de conclure, pour la construction GFP-Hyal2, que seule la protéine de PM inférieur (environ 70 kDa) serait sécrétée. C'est néanmoins une possibilité à explorer par la suite.

### **Observations microscopiques : le rôle de l'ancre GPI**

Par comparaison des différentes photographies présentées dans le chapitre des RESULTATS, il est incontestable que l'observation directe de l'EGFP fusionnée à Hyal2 présente des avantages par rapport au marquage immunocytochimique de la protéine. La fluorescence émise par l'EGFP met en évidence des détails subcellulaires invisibles lors de l'observation au moyen des anticorps. Un désavantage qui devrait toutefois être résolu est la forte diminution de la fluorescence de l'EGFP lorsque les cellules transfectées subissent une perméabilisation au Triton X-100 avant le marquage immunocytochimique intracellulaire.

L'observation de la fluorescence de l'EGFP sans fixation permet également de suivre une dynamique intracellulaire. Dans ce cas, des vésicules en mouvement chargées d'EGFP ont été observées ; elles évoluent probablement le long de microtubules. L'origine de ces vésicules et leur devenir ne peuvent pas être déterminés avec les techniques microscopiques simples utilisées ; des méthodes plus sophistiquées comme l'observation à 37°C et le "FRET" (fluorescence resonance energy transfer) ou le "FRAP" (fluorescence recovery after photobleaching) apporteraient certainement plus de renseignements (Lippincott-Schwartz et al., 2001).

Les résultats de la microscopie affichent une nette différence de localisation entre GFP-Hyal2 et GFP-Hyal2ΔGPI. Les différents marquages aux anticorps anti-calréticuline et anti-M6PR, ainsi que le marquage extra-cellulaire, nous permettent d'affirmer que la protéine GFP-Hyal2 est présente dans le RE, le réseau trans-Golgi et la membrane plasmique. Une fraction a pu également être détectée dans des vésicules hors du RE. Pour la construction GFP-Hyal2ΔGPI, par contre, une très grande majorité des protéines se localisent dans le RE et une très faible proportion dans le réseau trans-Golgi. On peut en conclure, comme déjà noté pour d'autres protéines (McDowell et al., 1998), que l'ancre GPI d'Hyal2 a une fonction "dynamique" en conduisant les molécules hors du RE vers des localisations subcellulaires, comme le trans-Golgi, la membrane plasmique et certaines vésicules, où l'enzyme pourrait exercer ses fonctions.

### **Observations microscopiques : l'image réticulaire**

La mise en évidence du RE est présente dans les cellules transfectées à l'aide des deux chimères, avec une prédominance pour celle privée d'ancre GPI.

La situation de la protéine GFP-Hyal2ΔGPI peut être en partie expliquée. La présence du peptide signal dirige la protéine à l'intérieur du RE, mais l'absence d'extrémité C-terminale hydrophobe empêche l'ancrage GPI en membrane du RE et ainsi la poursuite du trajet intracellulaire naturel de la protéine. La cellule connaît alors un engorgement du RE.

Toutefois, un paradoxe apparaît entre les images microscopiques et l'analyse par Western blot. Alors que la protéine GFP-Hyal2ΔGPI est en partie sécrétée dans le milieu environnant, aucune vésicule cytoplasmique n'est visible en dehors du RE. Le trajet dans les voies de sécrétion serait donc particulièrement rapide.

Dans le cas des cellules transfectées par la chimère possédant l'ancre GPI, il est possible que l'apparition du RE signifie une surcharge de protéines dans cet organe. L'activité du complexe de la transamidase (enzyme qui clive et remplace l'extrémité C-terminale hydrophobe) pourrait être trop faible par rapport à la quantité de protéines exprimées dans la cellule. Un désengorgement devrait donc être observé en cas d'épuisement ou d'arrêt de la traduction des protéines. C'est ce qui a été envisagé dans les expériences de traitement à la cycloheximide ou lors de l'observation à des temps plus longs après la transfection. Cependant, les résultats n'ont pas permis de renforcer l'hypothèse.

### **Observations microscopiques : l'image en surface cellulaire**

Des images très étonnantes ont été obtenues grâce aux anticorps anti-GFP mis en présence de la cellule non perméabilisée au Triton X-100. Il existe une différence flagrante entre les deux constructions : la présence de l'ancre GPI produit un marquage punctiforme sur l'ensemble des membranes plasmiques. Ceci évoque le "crosslinking and clustering" des protéines à ancre GPI qui est généralement observé dans la membrane après exposition à des anticorps (Friedrichson & Kurzchalia, 1998).

La présence d'une ancre GPI semble totalement nécessaire pour la localisation en membrane de la protéine Hyal2. On peut toutefois se demander pourquoi un marquage à l'anticorps anti-Hyal2 n'a pas apporté les mêmes résultats. L'épitope de l'anticorps anti-Hyal2 pourrait être difficilement reconnu à la surface des cellules de par sa position "enfouie". Posséder un anticorps anti-Hyal2 dont l'épitope se situe dans une partie plus proximale de la protéine serait intéressant.

On pourrait recourir à d'autres techniques afin de s'assurer que la protéine se situe en surface cellulaire : par exemple, une biotinylation des protéines en surface suivie d'une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps anti-GFP ou anti-Hyal2.

### **Perspectives**

Les analyses microscopiques et en Western blot ont été réalisées au moyen de cellules transfectées transitoirement. Des observations en cellules transfectées de manière stable ont récemment été entamées au laboratoire. Il serait encore préférable de choisir des cellules exprimant Hyal2 endogène de façon suffisante ; cependant, de telles cellules n'ont pas encore été découvertes.

\*\*\*\*\*

## 6 Bibliographie

- Afify A.M., Stern M., Guntenhöner M., and Stern R.** (1993) Purification and characterization of human hyaluronidase. *Arch Biochem Biophys* **305**: 434-441.
- Alberti A., Murgia C., Liu S.L., Mura M., Cousens C., Sharp M., Miller A.D., and Palmarini M.** (2002) Enveloppe-induced cell transformation by ovine betaretrovirus. *J Virol* **76**: 5387-5394.
- Anderson R.G.W.** (1993) Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10909-10913.
- Ashford D., and Platt F.** (1999) Protein glycosylation. *In* : *Post-translational Processing, a practical approach*. Oxford University Press. pp135-174.
- Austin C.R.** (1960) Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1**: 310-311.
- Benting J.H., Rietveld A.G. and Simons K.** (1999). N-glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **146**: 313-320.
- Brown D.A., and London E.** (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**: 17221-17224.
- Burns J.M. Jr., Belk C.C., and Dunn P.D.** (2000) A protective glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein of *Plasmodium yoelii* trophozoites and merozoites contains two epidermal growth factor-like domains. *Infect Immun* **68**: 6189-6195.
- Camenisch T.D., Spicer A.P., Brehm-Gibson T., Biesterfeldt J., Augustine M.L., Calabro A.Jr., Kubalak S., Klewer S.E., and McDonald J.A.** (2000) Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* **106**: 349-360.
- Cherr G.N., Yudin A.I. and Overstreet J.W.** (2001). The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol* **20** 515-525.
- Comtesse N., Maldener E., and Meese E.** (2001) Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 634-640.
- Csoka A.B., Frost G.I., and Stern R.** (2001) The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* **20**: 499-508.
- Cubitt A.B., Heim R., Adams S.R., Boyd A.E., Gross L.A., and Tsien R.Y.** (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448-455.

- Davis C.G.** (1990) The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol* **2**: 410-419.
- Debacq C.** (1999) Etude préliminaire de l'expression de l'hyaluronidase HYAL2 dans les organes du rat et après transfection *in vitro*. *Mémoire*, FUNDP, Namur, Belgique.
- Deborah A., Brown, and Erwin** (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**: 17221-17224.
- Dirks C., Duh F.M., Lerman M.I., and Miller A.D.** (2002) Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus. *J Virol* **76**: 2141-2149.
- Doering T.L. and Schekman R.** (1996). GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles. *EMBO J* **15**: 182-191.
- Duran-Reynals F.** (1928) Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. *CR Soc Biol* **99**: 6-7.
- Eisenhaber B., Bork P., and Eisenhaber F.** (1998) Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* **11**: 1155-1161.
- Eisenhaber B., Bork P., and Eisenhaber F.** (2001) Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Eng* **14**: 17-25.
- Evanko S.P., and Wight T.N.** (1999) Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem* **47**: 1331-1341.
- Ferguson M.A.** (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* **112**: 2799-2809.
- Field M.C., Moran P., Li W. Keller G.A. and Caras I.W.** (1994). Retention and degradation of proteins containing an uncleaved glycosylphosphatidylinositol signal. *J Biol Chem* **269**: 10830-10837.
- Fiszer-Szafarz B., Litynska A., and Zou L.** (2000) Human hyaluronidases :electrophoretic multiple forms in somatic tissues and body fluids. Evidence for conserved hyaluronidase potential N-glycosylation sites in different mammalian species. *J Biochem Biophys Methods* **45**: 103-116.
- Flamion B., Mertens-Strijthagen J., and Boël P.**(1998) Cloning of the cDNA for a rat hyaluronidase expressed in the kidney. *FASED J* **12**: A423.
- Friedrichson T., and Kurzchalia T.V.** (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**: 802-805.
- Frost G.I., Csoka T., and Stern R.** (1996) The hyaluronidases : a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosci Glycotechnol* **8**: 419-434.



- Frost G.I., Csoka T.B., Wong T., and Stern R.** (1997). Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 10-15.
- Gillot E.** (1998) Devenir intracellulaire d'une hyaluronidase révélé par différentes constructions moléculaires. *Mémoire*, FUNDP, Namur, Belgique.
- Henrissat B., Callebaut I., Fabrega S., Lehn P., Mornon J.-P., and Davies G.** (1995) Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7090-7094.
- Hooper M., and McIlhinney** (1999) Lipid modification of protein. *In* : *Post-translational Processing, a practical approach*. Oxford University Press. pp175-203.
- Horejsi V., Drbal K., Cebecauer M., Cerny J., Brdicka T., Angelisova P., and Stockinger H.** (1999) GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol Today* **20**: 356-361.
- Ikezawa H., Yamanegi M., Taguchi R., Miyashita T., and Ohyabu T.** (1976) Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. purification, properties and phosphatase-releasing activity. *Biochim Biophys Acta* **450**: 154-164.
- Jacobson K. and Dietrich C.** (1999). Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol* **9** 87-91.
- Karp G.** (1998). *Biologie moléculaire et cellulaire*. DeBoeck Université. Paris-Bruxelles.
- Kopito R.R.** (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation *Trends Cell Biol* **10**: 524-530.
- Laurent T.C. ed.** (1998) *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*. Portland Press, London & Miami.
- Lee J.Y., and Spicer A.P.** (2000) Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 581-586.
- Lepperdinger G., Müllegger J., and Kreil G.** (2001) Hyal2-less active but more versatile? *Matrix Biol* **20**: 509-514.
- Lepperdinger G., Strobl B., and Kreil G.** (1998) HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem* **273**: 22466-22470.
- Lin Y., Kimmel L.H., Myles D.G., and Primakoff P.** (1993) Molecular cloning of the human and the monkey sperm surface protein PH-20. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10071-10075.
- Lippincott-Schwartz J.** (2001) The secretory membrane system studied in real-time. *Histochem Cell Biol* **116**: 97-107.
- Lippincott-Schwartz J., Snapp E. and Kenworthy A.** (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 444-456.

- Low M.G., and Finean J.B.** (1977) Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem J* **167**: 281-284.
- Markovic-Housley Z., Miglierini G., Soldatova L., Rizkallah P. J., Müller U. and Schirmer T.** (2000). Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* **8** 1025-1035.
- McDowell M.A., Ransom D.M and Bangs J.D.** (1998). Glycosylphosphatidylinositol-dependent secretory transport in *Trypanosoma Brucei*. *Biochem J* **335**: 681-689.
- Mertens-Strijthagen J., Jadot M. and Flamion B.** (2002). Résultats non publiés.
- Mertens-Strijthagen J., Boël P., Lacreman J. and Flamion .B.** (2000). Hyal-2, a hyaluronidase expressed in the kidney, generates proinflammatory fragments of hyaluronan. *J Am Soc Nephrol* **11**: 533A.
- Meyer K.** (1971) Hyaluronidases. In : *The Enzymes*, 3<sup>rd</sup> Ed., Vol. V. Boyer P.D., Ed. Academic Press, New-York. pp. 307-320.
- Morise H., Shimomura O., Johnson F.H., and Winant J.** (1974) *Biochemistry* **13**: 2656-2662.
- Muniz M., and Riezman H.** (2000) Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J* **19**: 10-15
- Muniz M., Morsomme P., and Riezman H.** (2001) Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* **104**: 313-320.
- Nichols B. J., Kenworthy A.K., Polishchuk R.S., Lodge R., Roberts T., Hirschberg K., Phair R.D and Lippincott-schwartz J.** (2001). Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and golgi complex. *J Cell Biol* **153** 529-541.
- Nichols B.J. and Lippincott-schwartz J.** (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* **11**: 406-412.
- Noble P.W.** (2002). Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* **21** 25-29.
- Nosjean O., Briolay A., and Roux B.** (1997) Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochem Biophys Acta* **1331**: 153-186.
- Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., and Remington S.J.** (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392-1395.
- Patankar S., Fujioka H., and Wirth D.F.** (2000) The signal sequence and C-terminal hydrophobic domain are required for localization of the sexual stage antigen pgs28 to the surface of P. gallinaceum ookinetes. *Mol Biochem Parasitol* **111**: 425-435.

- Pless D.D., and Lennarz W.J.** (1977) Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 134-138.
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., and Cormier M.J.** (1992) *Gene* **111**: 229-233.
- Rai S.K., Duh F.-M., Vigdorovich V., Danilkovitch-Miagkova A., Lerman M.I., and Miller A.D.** (2001) Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4443-4448.
- Rosti V.** (2000) The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* **85**: 82-87.
- Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H., Ohshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Kuhara S., and Hayashi H.** (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 996-1001.
- Simons K. and Ikonen E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387** 569-572.
- Simpson J.C., Neubrand V.E., Wiemann S., and Pepperkok R.** (2001) Illuminating the human genome. *Histochem Cell Biol* **115**: 23-29.
- Stern R., and Csoka A.** (2000) Mammalian hyaluronidases.  
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/>
- Strobl B., Wechselberger C., Beier D.R., and Lepperdinger G.** (1998) Structural organization and chromosomal localization of Hyal2, a gene encoding a lysosomal hyaluronidase. *Genomics* **53**: 214-219.
- Triggs-Raine B., Salo T.J., Zhang H., Wicklow B.A. and Natowicz M.R.** (1999). Mutations in Hyal1, a member of tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** 6296-6300.
- Tsien R.Y.** (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544.
- Udenfriend S., and Kodukula K.** (1995) Prediction of omega site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. *Methods Enzymol.* **250**: 571-582.

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1	L'HYALURONAN : BREVE INTRODUCTION .....	1
1.2	LES HYALURONIDASES.....	1
1.2.1	Classification.....	1
1.2.2	PH-20.....	3
1.2.3	Hyal1 .....	3
1.2.4	Autres hyaluronidases de mammifères.....	4
1.2.5	Hyal2.....	4
1.2.5.1	Le gène et la structure de la protéine .....	4
1.2.5.2	Distribution tissulaire et localisation cellulaire.....	5
1.2.5.3	Fonctions .....	6
1.2.5.4	Hyal2, un récepteur à ancrage GPI ? .....	6
1.2.6	Rôles des hyaluronidases dans la dégradation de l'hyaluronan.....	6
1.3	PROTEINES A ANCRE GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL (GPI) .....	7
1.3.1	L'ancre GPI .....	8
1.3.2	Structure et biosynthèse des ancres GPI.....	8
1.3.3	Outil de prédiction des ancres GPI.....	9
1.3.4	Devenir des protéines à ancre GPI.....	10
1.3.4.1	Généralités.....	10
1.3.4.2	Endocytose .....	11
1.3.4.3	Export sans clivage.....	12
1.3.4.4	Sécrétion par hydrolyse .....	12
1.3.4.5	Protéolyse .....	12
1.3.5	Fonctions des protéines à ancre GPI.....	12
1.3.5.1	Activation cellulaire .....	13
1.3.5.2	Activation enzymatique.....	13
1.3.5.3	Rôle de l'internalisation des protéines GPI.....	14
1.3.5.4	Rôle de la libération de protéines GPI.....	14
1.4	LA " GREEN FLUORESCENT PROTEIN " (GFP).....	15
1.4.1	Introduction.....	15
1.4.2	Propriétés physico-chimiques .....	15
1.4.3	L'EGFP (Enhanced GFP).....	16
1.4.4	L'EGFP en tant que marqueur moléculaire.....	16
<b>2</b>	<b>BUTS DU TRAVAIL .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>20</b>
3.1	METHODES CONCERNANT L'ADN .....	20
3.1.1	Culture de bactéries .....	20
3.1.1.1	Milieu de culture.....	20
3.1.1.2	Antibiotiques .....	20
3.1.2	Préparation d'ADN plasmidique.....	21
3.1.2.1	Protocole de la mini-préparation.....	21
3.1.2.2	Protocole de la maxi préparation .....	22
3.1.3	Quantification de l'ADN au spectrophotomètre.....	22
3.1.4	Electrophorèse en gel d'agarose.....	22
3.1.4.1	Principe.....	22
3.1.4.2	Solutions.....	23
3.1.4.3	Protocole.....	23
3.1.5	Restriction de l'ADN .....	24
3.1.6	PCR.....	25
3.1.7	Purification de l'ADN à partir d'un gel d'agarose.....	26
3.1.8	Ligation .....	26
3.1.9	Purification de l'ADN .....	27
3.1.9.1	Extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique .....	27
3.1.9.2	Précipitation à l'éthanol.....	28
3.1.10	Transformation des bactéries.....	28
3.1.10.1	Cellules électrocompétentes .....	28

## TABLE DES MATIERES

3.1.10.2	Transformation par électroporation.....	29
3.1.11	<i>Séquençage automatique</i> .....	30
3.1.11.1	Réaction de séquençage .....	30
3.2	METHODES CONCERNANT LES PROTEINES .....	31
3.2.1	<i>Préparation cellulaire</i> .....	31
3.2.1.1	Repiquage des cellules COS-7.....	31
3.2.1.2	Récupération des extraits cellulaires et dosage des protéines .....	32
3.2.1.3	Concentration des milieux de culture cellulaire.....	32
3.2.2	<i>Transfection cellulaire</i> .....	33
3.2.3	<i>Western blot</i> .....	34
3.2.3.1	Principe.....	34
3.2.3.2	Réactifs.....	34
3.2.3.3	Electrophorèse en gel de polyacrylamide .....	35
3.2.3.4	Traitement et dépôt des échantillons sur le gel.....	36
3.2.3.5	Migration.....	37
3.2.3.6	Transfert de protéines sur membrane en environnement semi-sec .....	37
3.2.3.7	Traitement au rouge Ponceau .....	38
3.2.3.8	Elimination des sites de liaison non spécifiques de la membrane.....	38
3.2.3.9	Addition de l'anticorps primaire.....	39
3.2.3.10	Addition de l'anticorps secondaire.....	39
3.2.3.11	Révélation des anticorps.....	39
3.3	MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIQUE.....	40
3.3.1	<i>Solutions utilisées lors des différents protocoles</i> .....	40
3.3.2	<i>Préparation des lamelles couvre-objet à observer sans fixation des cellules</i> .....	42
3.3.3	<i>Marquage fluorescent des épitopes dans toute la cellule</i> .....	42
3.3.4	<i>Marquage fluorescent des épitopes en surface cellulaire</i> .....	43
3.4	MICROSCOPIE A FLUORESCENCE .....	44
3.4.1	<i>Microscopie non confocale</i> .....	44
3.4.2	<i>Microscopie confocale</i> .....	45
4	<b>RESULTATS</b> .....	<b>46</b>
4.1	ANALYSE DE LA SEQUENCE EN ACIDES AMINES D'HYAL2.....	46
4.1.1	<i>Informations disponibles dans les banques de données à propos d'Hyal2</i> .....	46
4.1.2	<i>Analyse supplémentaire de la séquence d'Hyal2</i> .....	47
4.1.2.1	Sites de N-glycosylation.....	47
4.1.2.2	Domaines EGF-like .....	47
4.1.2.3	Détermination de la présence d'une ancre GPI.....	48
4.1.3	<i>Modélisation tridimensionnelle</i> .....	48
4.1.4	<i>Conclusion</i> .....	49
4.2	CONSTRUCTION DE PLASMIDES .....	50
4.2.1	<i>Introduction : le plasmide pJMEGFP</i> .....	50
4.2.2	<i>La construction GFP-Hyal2ΔGPI</i> .....	51
4.2.3	<i>La construction GFP-GPI</i> .....	53
4.2.4	<i>Conclusion</i> .....	54
4.3	WESTERN BLOTS .....	55
4.3.1	<i>Introduction</i> .....	55
4.3.2	<i>Expression de GFP-Hyal2 et de GFP-Hyal2ΔGPI</i> .....	55
4.3.3	<i>Conclusion</i> .....	59
4.4	OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES CONSTRUCTIONS .....	60
4.4.1	<i>Expériences préliminaires</i> .....	60
4.4.2	<i>Validité du couplage à l'EGFP</i> .....	61
4.4.3	<i>Observation des cellules sans fixation</i> .....	61
4.4.4	<i>Observations des cellules fixées au paraformaldéhyde</i> .....	63
4.4.5	<i>Marquage immunocytochimique de la calréticuline</i> .....	64
4.4.6	<i>Marquage immunocytochimique du récepteur du mannose-6 phosphate</i> .....	65

## TABLE DES MATIERES

---

4.4.7	<i>Traitement des cellules à la bréfeldine.....</i>	66
4.4.8	<i>Traitement des cellules à la cycloheximide.....</i>	67
4.4.9	<i>Observation des cellules à différents moments après la transfection.....</i>	68
4.4.10	<i>Marquage immunocytochimique en surface cellulaire .....</i>	68
4.4.11	<i>Conclusion .....</i>	70
<b>5</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>77</b>

## TABLE DES MATIERES

---